

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS

SHARLLES BATISTA MARTINS

EXTRATO BRUTO DE PRÓPOLIS VERMELHA
BRASILEIRA: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO,
ANTIBIOFILME E AVALIAÇÃO INTRAMACROFÁGICA FRENTE A
ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS

UBERLÂNDIA – MG

2024

SHARLLES BATISTA MARTINS

**EXTRATO BRUTO DE PRÓPOLIS VERMELHA
BRASILEIRA: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO,
ANTIBIOFILME E AVALIAÇÃO INTRAMACROFÁGICA FRENTE A
ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique G. Martins

UBERLÂNDIA – MG

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M386 2024	Martins, Sharlles Batista, 1980- EXTRATO BRUTO DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO, ANTIBIOFILME E AVALIAÇÃO INTRAMACROFÁGICA FRENTE A ESPÉCIES DE MICOBACTÉRIAS [recurso eletrônico] / Sharlles Batista Martins. - 2024. Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.417 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Citologia. I. Martins, Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes, 1968-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título. CDU: 576.3
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas
Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 03/2024, do PPGBC				
Data:	06 de Agosto de 2024	Hora de início:	14:07	Hora de encerramento:	16:36
Matrícula do Discente:	12212BCE001				
Nome do Discente:	Sharlles Batista Martins				
Título do Trabalho:	Extrato bruto de própolis vermelha brasileira: investigação do potencial antibacteriano, antibiofilme e avaliação intramacrofágica frente a espécies de micobactérias				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais e sintéticos				

Reuniu-se por Videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas/PPGBC, assim composta: Professores Doutores: **Marta Chagas Monteiro** - UFPA; **Francisco José Torres de Aquino** – UFU; e **Carlos Henrique Gomes Martins** orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. **Carlos Henrique Gomes Martins**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente **Sharlles Batista Martins** a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Gomes Martins, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/08/2024, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco José Torres de Aquino, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/08/2024, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marta Chagas Monteiro, Usuário Externo**, em 06/08/2024, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5526936** e o código CRC **316957FB**.

Referência: Processo nº 23117.044415/2024-69

SEI nº 5526936

Criado por [regiembinsky](#), versão 5 por [carlos.martins2](#) em 06/08/2024 16:36:24.

À memória afetuosa de minha avó, Geracina, que partiu
antes de compartilhar comigo da alegria deste momento.
Sua simplicidade era um farol, sua sabedoria, um guia.
Mesmo que não esteja fisicamente entre nós, sua
presença é sentida profundamente em cada conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao único e imutável Deus, infinito em perfeição, seja dada toda a glória, honra e louvor. Sou grato pelas bênçãos que permearam esta jornada, pelos obstáculos que foram superados com sua ajuda e pelos momentos de inspiração que vieram de sua divina providência.

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. Carlos Henrique G. Martins, expresso minha profunda gratidão por sua generosidade em compartilhar não apenas seu tempo, mas também seu vasto conhecimento e rica experiência. Sua orientação foi além da mera supervisão, pois se tornou um mentor inspirador e um amigo valioso que deixou uma marca indelével em minha trajetória acadêmica e profissional.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciência Biomédicas da UFU, agradeço o inestimável privilégio de ter sido discípulo de mestres tão sábios, dedicados e inspiradores.

À minha amada esposa Nathália, companheira incansável nesta jornada, agradeço por criar um ambiente de apoio e equilíbrio que se revelou essencial para conciliar a exigente vida acadêmica e os momentos preciosos em família. Sua dedicação e compreensão não apenas facilitaram, mas também enriqueceram cada passo rumo a degraus mais elevados.

Aos meus filhos, Icaro, Samuel e Alice, meu agradecimento pelo amor incondicional que me sustenta por toda a vida. Vocês são a minha maior conquista.

Aos meus queridos pais, Adimar e Wilma, expresso minha gratidão por não apenas me concederem uma educação sólida, mas também por transmitirem valores que guiaram meu caminho ao longo deste percurso de mestrado e que conservarei por toda a vida.

Aos meus familiares, por serem fontes inesgotáveis de amor e encorajamento.

Agradeço imensamente à turma do Laboratório de Ensaio Antimicrobianos (LEA), Jonathan, Mariana, Daniela e Nagela pelo suporte e disposição em dividir comigo seus conhecimentos.

Aos amigos da Escola Técnica de Saúde (ESTES-UFU), Ralciane por todo o auxílio e paciência e Prof. Dr. Reginaldo pelas enriquecedoras contribuições.

Aos colegas Samuel e Guilherme do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução (LABIFIR) e Natasha e Igor do Laboratório de Pesquisa Antivirais (LAPAV) por todos os ensinamentos generosamente compartilhados.

Aos amigos da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) do Hospital de Clínicas da UFU pelo apoio e incentivo.

*Quanto mais eu estudo a natureza, mais me
maravilho com a obra do Criador.*
Louis Pasteur

RESUMO

A tuberculose persiste como uma séria ameaça à saúde global, sendo a principal causa de morte por doença infecciosa. O controle da doença é um desafio, especialmente diante do aumento das cepas resistentes a medicamentos. Além disso, as micobactérias não-tuberculosas estão emergindo como uma fonte significativa de infecções, com opções de tratamento limitadas. A própolis vermelha brasileira (PVB) tem despertado interesse devido às suas propriedades antibacterianas promissoras, porém seu potencial contra o gênero *Mycobacterium* ainda não havia sido explorado na literatura. Este estudo objetivou investigar, *in vitro*, o potencial antimicobacteriano do extrato hidroalcoólico bruto de PVB (EBPVB), tanto isoladamente quanto em combinação com antibióticos padrão, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima e do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIM/ICIF), avaliar seu efeito na inibição da formação de biofilmes, verificar sua citotoxicidade em macrófagos Raw 264.7 e analisar sua eficácia contra bacilos intracelulares, utilizando cultura de células e ensaio de luminescência. Os resultados revelaram que o EBPVB apresentou atividade satisfatória contra a maioria das cepas testadas, com CIMs variando entre 31,25 e 250 µg/mL, destacando-se sua eficácia contra *M. tuberculosis* isolado clínico resistente à rifampicina. A associação do EBPVB com isoniazida e rifampicina teve um efeito indiferente, o que viabilizaria sua coadministração, pois, além da ação sinérgica, a própolis pode oferecer benefícios adicionais, como a modulação da resposta imunológica. Além disso, o EBPVB demonstrou eficácia na inibição da formação de biofilmes micobacterianos e redução de sua viabilidade, não apresentou citotoxicidade relevante nas concentrações equivalentes à CIM e ½ CIM das micobactérias analisadas e demonstrou notável capacidade de erradicar bacilos intramacrofágicos, comparável ou superior ao antibiótico isoniazida. Pode-se concluir que o EBPVB demonstra uma atividade antimicobacteriana promissora, contudo, são necessários estudos adicionais para avaliar seus efeitos *in vivo* e suas propriedades contra as diferentes espécies de *Mycobacterium*.

Palavras-chave: *Mycobacterium*. Própolis vermelha brasileira. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Tuberculosis remains a significant global health concern, being the primary cause of death from infectious diseases. Controlling the disease is challenging, particularly with the rise of drug-resistant strains. Additionally, non-tuberculous mycobacteria are increasingly causing infections, with limited treatment options available. Brazilian red propolis (BRP) has attracted attention due to its potential antibacterial properties, but its efficacy against the *Mycobacterium* is largely unexplored. This study aimed to assess the *in vitro* antimycobacterial potential of BRP's crude hydroalcoholic extract (CHEBRP), both alone and in association with standard antibiotics. The investigation included determining the Minimum Inhibitory Concentration and Fractional Inhibitory Concentration Index, assessing the inhibition of biofilm formation, evaluating cytotoxicity in Raw 264.7 macrophages, and testing efficacy against intracellular bacilli. CHEBRP showed significant activity against most tested strains, notably against rifampicin-resistant *M. tuberculosis*. Administering it alongside isoniazid and rifampicin had an indifferent effect, suggesting that its co-administration is feasible, as, in addition to the synergistic action, propolis may offer additional benefits, such as modulation of the immune response. Furthermore, CHEBRP inhibited mycobacterial biofilm formation, demonstrated low cytotoxicity, and effectively eradicated intramacrophagic bacilli. In conclusion, CHEBRP exhibits promising antimycobacterial activity, warranting further research to evaluate its *in vivo* effects and efficacy against *Mycobacterium* species.

Keywords: Mycobacterium. Brazilian red propolis, Antibacterial activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ATCC	“American Type Culture Collection”
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima do Biofilme
CLSI	“Clinical and Laboratory Standards Institute”
COAPER	Cooperativa de Apicultores de Canavieiras
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade Óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBPVB	Extrato Bruto de Própolis Vermelha Brasileira
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
FDA	“Federal Drug Administration”
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
INH	Isoniazida
LEA	Laboratório de Ensaios Antimicrobianos
mL	Mililitro
MNT	Micobactéria Não Tuberculosa
OMS	Organização Mundial de Saúde
RIF	Rifampicina
RR	Resistente à Rifampicina
TB	Tuberculose
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
CAPÍTULO I – Fundamentação Teórica	14
1 PRODUTOS NATURAIS	15
2 APITERAPIA	16
3 PRÓPOLIS	16
4 PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA	17
4.1 Origem Botânica e Domínios Fitogeográficos	17
4.2 Composição Química e Atividade Biológica	19
5 GÊNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	19
6 COMPLEXO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	21
7 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS	23
8 FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICOBACTERIANOS	24
9 MICOBACTÉRIAS E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	25
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO II - Manuscrito a ser submetido para publicação	31
Brazilian Red Propolis against Mycobacteria: <i>In vitro</i> assessment of antibacterial potential, synergistic activity, biofilm inhibition, and intramacrophage action	32

APRESENTAÇÃO

A tuberculose (TB) permanece como um dos maiores desafios para a saúde pública global, figurando entre as principais causas de mortalidade por doenças infecciosas, superada apenas pela COVID-19. A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a gravidade da situação e declarou a TB como uma emergência de saúde pública mundial. Em 2014, reforçou a luta contra a doença com o documento “The End TB Strategy”, que almeja uma redução de 95% na incidência global da TB até 2035.

Apesar de a TB ser uma enfermidade tratável e curável, a resistência aos medicamentos tem crescido devido ao uso inadequado e incompleto dos tratamentos disponíveis. Além disso, as micobactérias não-tuberculosas (MNTs), como *M. avium* e *M. kansasii*, surgem como patógenos oportunistas com crescente relevância clínica, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Essas bactérias são amplamente encontradas no ambiente, em equipamentos industriais e hospitalares, além de produtos alimentícios, animais e plantas, criando possíveis fontes de contaminação e doença em humanos.

A composição peculiar da parede celular das micobactérias, incluindo ácidos micólicos e arabinogalactano, confere-lhes resistência a muitos antibióticos e capacidade de sobrevivência no interior de macrófagos. Isso destaca a necessidade urgente de novos tratamentos, que possam penetrar e atuar eficazmente dentro dessas células imunes.

Neste contexto, a ciência contemporânea tem direcionado esforços para a exploração de produtos naturais como alternativas terapêuticas. A própolis, uma substância resinosa coletada por abelhas a partir de plantas, tem ganhado destaque devido à sua vasta gama de compostos bioativos, como flavonoides e terpenoides, conhecidos por suas propriedades antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antivirais, antitumorais e imunomoduladoras.

Entre os diversos tipos de própolis, a própolis vermelha brasileira (PVB), caracterizada por sua composição rica em isoflavonoides e benzofenonas preniladas, tem mostrado potencial significativo contra diversas bactérias. No entanto, a eficácia da PVB contra micobactérias, especialmente no contexto de infecções como a TB e infecções por MNTs, ainda não foi explorada profundamente.

Este trabalho visou preencher essa lacuna do conhecimento, investigando *in vitro* o potencial antimicobacteriano do extrato bruto de própolis vermelha brasileira (EBPVB). Foi avaliado a sua capacidade de inibir a formação de biofilmes, sua ação sinérgica com antibióticos convencionais e sua eficácia contra bacilos intracelulares. A pesquisa buscou contribuir para o

desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que possam oferecer alternativas eficazes e com menos efeitos adversos em comparação com as drogas sintéticas atualmente disponíveis.

A dissertação está estruturada em dois capítulos principais. O **Capítulo I** apresenta uma revisão da literatura sobre produtos naturais com ênfase na própolis vermelha brasileira e suas aplicações farmacológicas e antimicrobianas, além de abordar aspectos relevantes do gênero *Mycobacterium*. O **Capítulo II**, intitulado "Brazilian Red Propolis against Mycobacteria: In vitro assessment of antibacterial potential, synergistic activity, biofilm inhibition, and intramacrophage action", trata-se do manuscrito a ser submetido para publicação no periódico *Molecules* - ISSN: 1420-3049 (Fator de Impacto 4.6, Qualis CAPES A2 – Ciências Ambientais), em 2024, apresentando os resultados das investigações realizadas, incluindo a determinação da Concentração Inibitória Mínima, o Índice de Concentração Inibitória Fracionada, a avaliação da inibição da formação de biofilmes, a citotoxicidade em macrófagos Raw 264.7 e a eficácia contra bacilos intracelulares.

Espera-se que os resultados desta pesquisa incentivem novos estudos para a identificação de constituintes químicos, a padronização de extratos, a avaliação da estabilidade e a realização de pesquisas pré-clínicas sobre a eficácia e segurança da própolis vermelha brasileira. Além disso, almeja-se que avancem os estudos farmacológicos e toxicológicos, abrindo novas perspectivas para o tratamento das infecções micobacterianas.

1 PRODUTOS NATURAIS

Os Produtos Naturais (PNs) são metabólitos sintetizados por organismos, como plantas, animais vertebrados, insetos, corais, algas e microrganismos, durante suas atividades vitais. Esses compostos têm sido um tesouro valioso para a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Entre janeiro de 1981 e setembro de 2019, a maioria dos fármacos de pequenas moléculas aprovados pela agência americana FDA foi derivada direta ou indiretamente de PNs, destacando sua relevância histórica e contemporânea (NEWMAN; CRAGG, 2020).

A busca por compostos bioativos na natureza tem uma longa história. Por exemplo, os curares, obtidos de plantas como *Chondodendron* e *Strychnos*, eram usados por nativos sul-americanos em suas flechas de caça para paralisar animais. O alcaloide d-tubocurarina, isolado dessas plantas, serviu como precursor para bloqueadores neuromusculares em anestésias (PEREIRA et al., 2015).

O ácido acetilsalicílico (AAS), pioneiro dos fármacos sintéticos, foi originalmente derivado da casca de salgueiro (*Salix alba*) e sintetizado em 1897 por Felix Hoffman. Além de aliviar dores e febres, o AAS tem efeitos analgésicos, antipiréticos e previne doenças cardiovasculares devido às suas propriedades antiplaquetárias (MCCURDY; SCULLY, 2005).

A penicilina, descoberta por Alexander Fleming em 1928, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas. Essa substância antibiótica é produzida por fungos do gênero *Penicillium* (RAMÍREZ-RENDON et al., 2022).

Outro exemplo é o captopril, um medicamento anti-hipertensivo que inibe a enzima conversora de angiotensina (ECA). Sua descoberta envolveu a pesquisa do veneno da serpente jararaca (*Bothrops jararaca*) e a identificação da bradicinina, essencial para entender o sistema renina-angiotensina no controle da pressão arterial (BARREIRO, 2019).

Essa retomada histórica inspira investigações na descoberta de medicamentos a partir de PNs e evidencia a interconexão entre tradição e inovação na evolução da medicina. Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) enfatiza a importância de integrar as Medicinas Tradicionais e Complementares nos sistemas de saúde nacionais, como as “Práticas Integrativas e Complementares” (PICs) no Brasil. Essas abordagens terapêuticas baseiam-se em conhecimentos tradicionais e saberes populares, incluindo práticas como a apiterapia, com o objetivo de estimular a prevenção, promoção e recuperação da saúde (WHO, 2013).

2 APITERAPIA

A apiterapia utiliza produtos das abelhas como mel, própolis, geleia real, cera, apitoxina e outros para prevenir ou tratar doenças, uma prática milenar adotada por diversos povos. No Brasil, essa prática ganhou destaque não apenas pela qualidade dos produtos apícolas, mas também pela quantidade significativa de pesquisas e artigos relacionados. Estudos bibliométricos mostram que nosso país ocupou a primeira posição no número de publicações científicas sobre apiterapia entre 1980 e 2016, seguido pelos Estados Unidos, China, Japão e Turquia (ŞENEL; DEMIR, 2018).

A apicultura no Brasil teve início oficial em 1839 com a importação de colônias de abelhas da espécie *Apis mellifera scutellata* de Portugal. Posteriormente, outras espécies foram introduzidas por imigrantes europeus. Em 1956, a introdução das abelhas africanizadas pelo professor Warwick Estevan Kerr teve um impacto significativo na apicultura brasileira, resultando na "abelha africanizada", que se mostrou resistente a diversas pragas e doenças, fortalecendo o setor nacional (DA SILVA et al., 2018).

Os produtos apícolas, como a própolis, além do mel, têm sido estudados por suas propriedades nutricionais e medicinais desde tempos antigos. A pesquisa sobre própolis cresceu substancialmente na segunda metade do século XX, com estudos abordando sua química, origem botânica e propriedades biológicas, destacando seu potencial na descoberta de medicamentos naturais (CORNARA et al., 2017).

3 PRÓPOLIS

A própolis é um produto natural elaborado pelas abelhas a partir de resinas, gomas e bálsamos coletados de plantas, os quais são misturados com saliva, cera e pólen dentro das colmeias. Este composto desempenha um papel crucial na proteção das colmeias, oferecendo defesa contra invasores e contribuindo para a manutenção da saúde das abelhas e sua prole (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A palavra "própolis" deriva do grego "pro" (em defesa) e "polis" (cidade ou comunidade), destacando sua função defensiva nas colmeias. Utilizada há séculos na medicina popular, foi reconhecida cientificamente como uma substância terapêutica no século XVI, ganhando interesse crescente desde então (MARTINOTTI; RANZATO, 2015).

No Brasil, o estudo da própolis ganhou destaque a partir das contribuições de pesquisadores como Ernesto Ulrich Breyer, que demonstraram suas propriedades

antibacterianas e outros efeitos benéficos. Mais de 300 compostos foram identificados nas própolis, incluindo flavonoides, terpenos e terpenoides, os quais apresentam diversas atividades biológicas comprovadas, como antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antiviral, antitumoral e imunomoduladora (SALATINO; NEGRI, 2021).

A diversidade das própolis brasileiras é notável, variando em composição química e cores que vão do amarelo-escuro ao verde, influenciadas por fatores como a localização geográfica, a origem botânica das resinas, as espécies de abelhas, variações sazonais e métodos de extração. Essas características conferem às própolis brasileiras uma gama ampla de potenciais aplicações farmacológicas e terapêuticas (REGUEIRA et. al., 2017).

4 PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA

Em 2008, foi identificado o décimo terceiro tipo de própolis brasileira, caracterizado pela sua tonalidade vermelha e encontrado em colmeias localizadas ao longo da costa marítima e rios na Região Nordeste do Brasil, principalmente nos estados de Alagoas, Pernambuco e sul da Bahia (VIDAL, 2021).

Em razão do elevado teor de compostos fenólicos, inédito em qualquer outra variedade de própolis, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) conferiu, em 2012, uma certificação internacional à própolis vermelha de Alagoas, reconhecendo o estado como o único produtor global desse tipo específico de própolis. Esse reconhecimento, associado à singularidade de compostos químicos encontrados no produto, conferiu-lhe um notável valor comercial. Paralelamente, a própolis vermelha brasileira (PVB) tem despertado interesse crescente devido às suas propriedades terapêuticas já atestadas em diversos estudos (BOEING et al., 2021).

4.1 Origem Botânica e Domínios Fitogeográficos

De acordo com Kim e Park (2020), a melhor maneira de identificar a origem botânica da própolis é analisar sua composição química e compará-la com a constituição química da provável fonte vegetal.

Isso foi observado em estudos independentes de Silva et al. (2008) e Dausch et al. (2008) com o novo tipo de própolis descoberto. Dessa maneira, foram coletadas amostras da PV, assim como dos exsudatos de plantas autóctones. Os perfis fitoquímicos foram obtidos por técnicas de cromatografia e espectroscopia, e correlacionados. Diante dos resultados e pela

observação do comportamento das abelhas melíferas forrageiras que coletavam uma resina vermelha produzida por plantas da Família *Fabaceae* (*Leguminosae*) e a utilizavam na produção de própolis, concluíram que a espécie *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (*Fabaceae*) era a fonte botânica principal da própolis vermelha.

Dalbergia ecastaphyllum, popularmente chamada de “rabo-de-bugio”, “marmeleiro-da-mata” ou “verônica-branca” é reconhecida por seu pigmento vermelho intenso. É uma planta que pode ser encontrada tanto como uma trepadeira quanto um arbusto escandente, alcançando alturas de 1 a 3 metros. Seu crescimento é ramificado desde a base, e suas folhas são ovais ou alongadas, enquanto suas flores apresentam uma coloração que varia entre rosa e branca.

Essa espécie possui distribuição global, sendo encontrada no Brasil nos ecossistemas da Amazônia e da Mata Atlântica, ocupando áreas como dunas arenosas, regiões de mata aberta, campos arbustivos na região costeira, além das margens de manguezais e estuários. A presença de *D. ecastaphyllum* está confirmada em várias regiões, abrangendo o Norte (Pará e Amapá), o Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe), o Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo) e o Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina). Essa ampla distribuição geográfica é um testemunho da adaptabilidade e da capacidade dessa espécie de prosperar em diversas condições ambientais (CORADIN; CAMILLO; VIEIRA, 2022).

Um estudo recente em apiários da região Nordeste do Brasil demonstrou que a liberação da resina avermelhada de *D. ecastaphyllum* é um mecanismo de defesa da planta contra o ataque de uma espécie de besouro batizada de *Agrilus propolis* (Buprestidae), sendo este, portanto, um indutor da produção de PV. Tal fenômeno ainda não foi registrado em outras regiões produtoras do mundo (MIGLIORE et al., 2022).

Além disso, análises fitoquímicas e cromatográficas confirmaram recentemente uma fonte botânica secundária da PV daquela região: *Symphonia globulifera* L.f. (Clusiaceae), conhecida por “oanani”, “guanandi” e “ananim”, que contribui com uma variedade de constituintes químicos para a composição do produto, principalmente benzofenonas polipreniladas (CCANA-CCAPATINTA et al., 2020).

4.2 Composição Química e Atividade Biológica

De maneira geral, a PVB é composta por flavonóis (quercetina, retusapurpurina B e A, sendo estes últimos responsáveis pela cor vermelha do produto); flavanona (liquiritigenina), isoflavonas (daidzeina, formononetina, biochanina A, 7,4'-diidroxisoflavona), isoflavonoides (neovestitol, vestitol, e 4'-7-dimetoxi-2'-isoflavonol), neoflavonoides (dalbergina), chalcona (isoliquiritigenina), pterocarpanos (medicarpina e homopterocarpina) e benzofenonas polipreniladas (guttiferona E, xantochimol e oblongifolinas), sendo que maioria desses compostos não foi encontrada nos outros tipos de própolis brasileira, o que confere à PVB uma singularidade química (ALDANA-MEJIA et al., 2021).

Estudos indicam que a atividade biológica da PVB está principalmente associada à presença do flavonol kaempferol, formononetina e outras isoflavonas, que podem agir de maneira sinérgica com outros compostos (DE OLIVEIRA et al., 2019; DO NASCIMENTO et al., 2018). A formononetina desempenha um papel crucial nesse contexto, sendo considerada um marcador importante na identificação da PVB (TRUSHEVA et al., 2006; DAS NEVES et al., 2016), além dos compostos isoliquiritigenina, medicarpina, biochanina A e pinocembrina (DO NASCIMENTO et al., 2018). O kaempferol, por sua vez, é reconhecido por suas propriedades antioxidantes (KIM; PARK, 2020), enquanto o vestitol, neovestitol e outros componentes químicos foram investigados quanto à sua atividade antitumoral (NANI et al., 2018; SALEHI; HOSSEINI; KAZEMI, 2022).

Além disso, outras pesquisas têm demonstrado atividades biológicas relevantes tais como, propriedades antiparasitárias (DANTAS et al., 2017), antifúngicas (DAS NEVES et al., 2016), e até mesmo antivirais, incluindo ação contra o vírus SARS-CoV-2 (REFAAT et al., 2020), além de propriedades anti-inflamatórias (KITAMURA et al., 2018) e imunomoduladoras (MOISE; BOBIŞ, 2020), entre outras.

A literatura também destaca a atividade significativa dos extratos de própolis vermelha e seus metabólitos secundários contra diversas bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, associadas a doenças humanas, como enfermidades bucais, infecções crônicas sistêmicas e nosocomiais, incluindo aquelas que desenvolveram resistência a múltiplos medicamentos (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016; RUFATTO et al., 2018). No entanto, estudos sobre a atividade antimicrobiana do EBPVB contra espécies do gênero *Mycobacterium* não foram reportados.

5 GÊNERO MYCOBACTERIUM

O gênero *Mycobacterium* foi inicialmente proposto por Lehmann e Neuman em 1896 para acomodar organismos que, àquela época, eram considerados intermediários entre fungos e bactérias (MEEHAN et al., 2021). As micobactérias são bacilos delgados, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos, imóveis e incapazes de produzir esporos, conídios ou cápsulas. Apesar de serem classificadas como Gram-positivas, não adquirem coloração durante o procedimento de coloração de Gram, sendo preferencialmente coradas pelos métodos de Ziehl-Neelsen e Kenyon. Ambas as técnicas usam a carbolfucsina, proporcionando uma tonalidade vermelha às micobactérias. Em virtude de sua resistência à descoloração subsequente com solução álcool-ácido, essas bactérias foram designadas como BAAR - "bacilos álcool-ácido resistentes" (FORBES, 2017).

Essa característica de coloração é atribuída ao elevado teor de lipídios, aproximadamente 60%, que compõe a parede celular das micobactérias. Essa estrutura é predominantemente formada por uma membrana citoplasmática revestida por uma espessa camada de peptidoglicano (ácido N-glicolilmurâmico), covalentemente ligado às cadeias de arabinogalactano (polissacarídeo) que, por sua vez, são esterificadas em suas extremidades com ácidos graxos de cadeia longa, conhecidos como ácidos micólicos. Além disso, há proteínas e lipídios não ligados covalentemente a esse esqueleto basal (complexo arabinogalactano-peptidoglicano). Entre esses componentes, destaca-se o ácido micólico, responsável principalmente pela resistência das micobactérias à descoloração por álcool-ácido, assim como à ação de diversos agentes químicos e antibióticos, e pela capacidade de formação de biofilmes (HOLZHEIMER; BUTER; MINNAARD, 2021).

O ritmo de multiplicação é tipicamente lento e exibe considerável variação no gênero, permitindo classificá-las em micobactérias de crescimento rápido, com desenvolvimento visível em menos de sete dias, e micobactérias de crescimento lento, com crescimento visível após mais de sete dias (GAGNEUX, 2018). A maioria das espécies é saprófita, prosperando e se reproduzindo em ambientes naturais, enquanto uma parcela minoritária adapta-se ao ambiente intracelular, tornando-se patógenos preferenciais de vertebrados superiores (JACOBO-DELGADO et al., 2023).

De acordo com a curadoria conduzida pelo projeto "*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*" (LPSN), o gênero *Mycobacterium* abrange atualmente 195 espécies. Complexos e grupos dentro desse gênero estão constantemente sujeitos a subdivisões ou reclassificações por causa do sequenciamento genômico completo e pela crescente variedade

de alvos genéticos que ampliam o poder discriminatório (ARMSTRONG; EISEMANN; PARRISH, 2023).

Tão abrangente quanto a classificação das micobactérias é a sua capacidade de causar doenças em humanos. Algumas espécies são patógenos estritos, enquanto outras são oportunistas ou não patogênicas. Assim, além da classificação com base na velocidade de crescimento, é possível categorizar as micobactérias em duas amplas classes, conforme descrito por Runyon e colaboradores: aquelas que causam tuberculose (Complexo *Mycobacterium tuberculosis*), e as micobactérias não tuberculosas (MNT) (TURENNE, 2019).

6 COMPLEXO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*, capazes de desencadear a tuberculose (TB), uma doença infectocontagiosa de evolução crônica. No âmbito da saúde pública, destaca-se a *M. tuberculosis*, também conhecida como bacilo de Koch (BK), em homenagem ao bacteriologista alemão que identificou esse microrganismo como agente etiológico em 1882 (KOCH; MIZRAHI, 2018).

A TB afeta mais de um terço da população mundial e figura entre as principais causas de doença e mortalidade, constituindo a segunda causa de morte por uma patologia infecciosa, ficando atrás apenas da Covid-19. Para enfrentar esse desafio, os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela ONU e a Estratégia de Erradicação da Tuberculose da OMS estabeleceram metas ambiciosas para melhorar substancialmente esse panorama, incluindo uma redução de 90% nas mortes e de 80% na incidência entre os anos de 2015 e 2030 (WHO, 2015).

No entanto, a doença permanece como um desafio persistente para a saúde pública global. Conforme destacado pela própria OMS, em 2021 a pandemia de Covid-19 provocou um retrocesso nos progressos alcançados ao longo dos anos no controle da TB, exigindo uma reestruturação de iniciativas, serviços e infraestruturas de saúde em todos os países (WHO, 2022).

No território brasileiro, durante o ano de 2022, foram registrados oficialmente 78.057 novos casos de TB, o que representa um coeficiente de incidência de 36,3 casos por 100 mil habitantes. Estes casos estão predominantemente concentrados em grupos sociais vulneráveis, tais como pessoas em situação de pobreza e fome, indivíduos privados de

liberdade, minorias étnicas (como os indígenas) e aqueles vivendo com HIV/AIDS (BRASIL, 2023).

A doença é transmitida quando indivíduos com TB pulmonar liberam o agente infeccioso no ar por meio da fala, tosse ou espirro. Ao longo de milênios de coevolução com o *Homo sapiens*, o *M. tuberculosis* desenvolveu uma notável capacidade de adaptação ao sistema imunológico humano. Seu ciclo de vida é condicionado à sua habilidade de interagir com o sistema imunológico de maneiras diversas: o BK evita a resposta imune inicial, persiste mesmo diante de uma resposta imune adaptativa sem provocar doença sintomática e, para ser transmitido, desencadeia uma resposta inflamatória intensa que resulta em danos teciduais significativos (CHANDRA; GRIGSBY; PHILIPS, 2022).

Dessa maneira, a TB apresenta-se em uma ampla gama de estágios que vão desde uma infecção assintomática até uma doença potencialmente fatal. Ao penetrar o tecido pulmonar, *M. tuberculosis* atrai os macrófagos alveolares, os quais, ao tentarem defender o organismo da ameaça, fagocitam os bacilos e formam pequenos aglomerados chamados tubérculos (granulomas), onde a micobactéria permanece em estado latente, podendo persistir nessa condição por décadas (FURIN; COX; PAI, 2019).

Na fase latente, a TB é assintomática e não é transmitida, ao passo que no estágio ativo, *M. tuberculosis* consegue se reproduzir e se espalhar pelo corpo, tipicamente quando o sistema imunológico do indivíduo está comprometido (HOOK, 2022).

O tratamento da doença é eficaz, alcançando altas taxas de cura quando os bacilos respondem aos medicamentos e o regime terapêutico é estritamente seguido. Durante a fase intensiva, o objetivo é diminuir rapidamente a população de bacilos e eliminar aqueles que possam apresentar resistência natural a algum dos medicamentos. Na fase de manutenção, o objetivo é eliminar os bacilos latentes ou persistentes, reduzindo assim a possibilidade de recorrência da doença (ZHA; NAHID, 2019).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda que, no início do tratamento de adultos e adolescentes com tuberculose pulmonar e extrapulmonar, com exceção das formas meningoencefálica e osteoarticular, sejam utilizados quatro medicamentos em doses fixas e combinadas: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, durante os dois primeiros meses, correspondendo à fase intensiva do esquema básico. Em seguida, há uma fase de manutenção de quatro meses, durante a qual são utilizados apenas rifampicina e isoniazida (BARRETO-DUARTE et al., 2021).

Apesar dos esquemas de tratamento bem consolidados, os sistemas de saúde ao redor do mundo enfrentam um desafio considerável na busca por regimes terapêuticos eficazes

contra a bactéria, ao mesmo tempo em que são bem tolerados pelos pacientes. Infelizmente, a rápida disseminação de cepas multidrogas resistentes de *M. tuberculosis* agrava a situação atual, destacando a necessidade iminente de priorizar a descoberta de novos medicamentos antituberculose e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras (HE et al., 2020).

Em 2020, o Sistema Único de Saúde (SUS) atualizou os protocolos de tratamento da TB resistente a medicamentos, incorporando a bedaquilina e delamanida (BRASIL, 2021), os mais recentes antibióticos antituberculose desenvolvidos nas últimas quatro décadas. A bedaquilina obteve aprovação da agência americana FDA em 2012 e da Agência Europeia de Medicamentos em 2014, no entanto, já foram registrados casos de cepas de *M. tuberculosis* resistentes tanto à bedaquilina quanto à delamanida, corroborando a necessidade da descoberta de drogas com novos mecanismos de ação (TUKENMEZ et al., 2019).

7 MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

O termo "Micobactérias Não Tuberculosas" (MNT) ou "atípicas" engloba mais de 200 espécies do gênero *Mycobacterium*, identificadas até o momento, que não pertencem ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMBT) e são distintas de *M. leprae*. Esses organismos, com a capacidade de formar biofilmes, podem ser saprófitas, comensais e simbioses, amplamente encontrados no ambiente, frequentemente presentes no solo, no ar (incluindo poeira e gotículas), em reservatórios de água e sistemas de distribuição, estações de tratamento de esgoto, equipamentos industriais e hospitalares, além de produtos alimentícios, animais e plantas, criando possíveis fontes de contaminação e doença em humanos (NQWATA; OUÉDRAGO, 2022),

As doenças oportunistas causadas pelas MNT, conhecidas como micobacterioses, estão emergindo como um problema de saúde global. Esse fenômeno é atribuído ao progresso dos métodos de diagnóstico, à ampla realização de procedimentos médicos invasivos, ao envelhecimento da população e ao aumento crescente de condições imunossupressoras, como a infecção pelo HIV, ao uso de medicações por pacientes transplantados, com neoplasias hematológicas e doenças reumatológicas (JOHNSON et al., 2023).

Ao contrário das espécies do CMBT, que causam a tuberculose, as MNTs, demonstram um grande espectro de patogenicidade, que varia desde infecções assintomáticas até manifestações clínicas, tanto pulmonares quanto extrapulmonares, afetando diversas áreas do corpo, incluindo linfonodos, pele, ossos, tendões, olhos, rins, entre outros (JOHANSEN; HERRMANN; KREMER, 2020).

Segundo dados do MS, no período de 2013 a 2019, foram registrados 2.731 novos casos de doença pulmonar causada por MNT no Brasil. A micobactéria mais frequentemente identificada foi a *M. kansasii*, com 622 casos, seguida pelas espécies do Complexo *M. avium*, que totalizaram 612 casos. Os sintomas pouco específicos da doença representam um desafio para o diagnóstico diferencial, especialmente considerando a necessidade de adaptar a abordagem terapêutica de acordo com a estirpe causadora (BRASIL, 2021).

8 FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICOBACTERIANOS

Biofilmes são comunidades complexas e altamente organizadas de microrganismos, tipicamente agrupados em uma superfície sólida ou líquida, e envoltos por uma matriz polimérica composta principalmente por exopolissacarídeos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Essa matriz forma uma estrutura tridimensional que mantém as células bacterianas unidas e protegidas do ambiente ao redor (DE LA FUENTE-NUNEZ; CESARO; HANCOK, 2023; NIÑO-PADILLA; VELAZQUEZ; GARIBAY-ESCOBAR, 2021).

A formação dos biofilmes compreende estágios distintos de crescimento: inicialmente, as células bacterianas livres ou planctônicas se ligam a uma superfície, ocorre uma adesão essencialmente irreversível e a matriz protetora é secretada. Em seguida, aglomerados celulares se formam dentro dessa matriz, as colônias se proliferam e alcançam maturidade. Por fim, algumas células se desprendem e se dispersam, permitindo a formação de novos biofilmes em outras áreas (SAUER et al., 2022).

Desde que o conceito surgiu, os biofilmes têm sido reconhecidos como um fator patogênico especialmente importante em afecções humanas. Enquanto infecções agudas são geralmente causadas por organismos planctônicos, a patogênese de doenças crônicas parece estar intimamente ligada à formação de biofilmes. Dessa maneira, a importância clínica dos biofilmes de micobactérias pode ser dividida em dois grupos: biofilmes em doenças causadas por MNT e biofilmes associados à tuberculose (CHARABORTY et al., 2021).

O espectro das micobacterioses é amplo, mas quase todas apresentam uma característica comum: tendem a ser crônicas. Uma das síndromes mais comuns causadas por MNT é a doença pulmonar, que afeta tipicamente pacientes com condições predisponentes, como tuberculose prévia, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística, bronquiectasias, infecção pelo HIV e transplantados. Nessa síndrome, está bem documentado que os biofilmes inicialmente colonizam o hospedeiro e, em seguida, podem contribuir para o

desenvolvimento de doença invasiva. Estudos destacam a importância do desenvolvimento de biofilmes na capacidade do *Mycobacterium avium* de invadir células epiteliais brônquicas (AKRAM; ATTIA, 2023).

Outro grupo relevante de infecções causadas por micobactérias atípicas e associadas a biofilmes são aquelas vinculadas a biomateriais, onde os microrganismos colonizadores atuam como patógenos oportunistas. Diversas infecções relacionadas a dispositivos médicos, como cateteres, próteses, telas abdominais, marca-passos, válvulas protéticas, entre outros, foram identificadas. Quase todas essas condições exigem a remoção do implante, uma vez que a terapia antibiótica isolada é insuficiente para erradicar os microrganismos estabelecidos no biofilme (NQWATA; OUÉDRAGO, 2022).

Assim, as células presentes nos biofilmes representam uma adaptação ao estresse, exibindo perfis genéticos e proteicos específicos que lhes conferem a capacidade de sobreviver em condições adversas, persistir e causar infecções crônicas, além de contribuir para os mecanismos de resistência aos antibióticos (OJHA et al., 2008).

No contexto específico da TB, a habilidade do *M. tuberculosis* de sobreviver por longos períodos, apesar de uma resposta imunológica sustentada e do tratamento com antibióticos durante a fase ativa da doença, é comparável à persistência observada em infecções crônicas causadas por patógenos que formam biofilmes (BACON; WADDELL; FLORES-VALDEZ, 2022).

No entanto, embora já tenha sido demonstrado que o *M. tuberculosis* possa formar biofilmes *in vitro*, e de descobertas recentes evidenciarem a presença de biofilmes nos pulmões de cobaias, contribuindo para a virulência e resistência aos antibióticos, ainda há escassez de marcadores moleculares e bioquímicos para confirmar sua ocorrência *in vivo* (CHAKRABORTY et al., 2021).

Essas descobertas suscitam interesse nos mecanismos de formação de biofilme como potenciais alvos para novas terapias. Contudo, as implicações clínicas ainda precisam ser elucidadas, e estudos futuros provavelmente fornecerão uma nova perspectiva sobre a tuberculose como uma doença associada aos biofilmes, complementando seus outros fatores de virulência (RICHARDS; OJHA, 2014).

9 MICOBACTÉRIAS E RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Entre os anos 1930 e 1960, conhecido como a "era de ouro" dos antibióticos, ocorreu um avanço significativo no desenvolvimento de diversas classes desses medicamentos.

No entanto, desde então, a descoberta de novos antibióticos tem sido limitada. O uso indiscriminado e muitas vezes inadequado desses fármacos em humanos, animais e na produção de alimentos tem promovido a seleção e disseminação de bactérias resistentes. Isso resultou na emergência da resistência bacteriana como uma séria ameaça global à saúde pública (WANG et al, 2018).

Organizações ao redor do mundo reconhecem a crescente resistência aos antibióticos como um problema significativo. Apesar das recomendações e resoluções para mitigar o problema, tem sido observado o surgimento contínuo de numerosos patógenos bacterianos resistentes a múltiplos medicamentos. Um exemplo é o *M. tuberculosis* multirresistente, que representa uma ameaça substancial para os esforços globais de controle da tuberculose (ROCA et al., 2015; ASLAM, 2021).

A resistência bacteriana aos medicamentos envolve diversos mecanismos, incluindo alterações na parede celular, biotransformação intracelular de fármacos, mutações genéticas, bombas de efluxo e formação de biofilmes. A classificação das cepas de tuberculose (TB) quanto à resistência inclui monorresistência, polirresistência, resistência à rifampicina (TB RR), multirresistência (TB MDR) e resistência extensiva (TB XDR) (SADERI et. al., 2022).

No Brasil, entre 2015 e 2022, foram registrados 7.938 novos casos de TB drogarresistente, com desafios significativos de subnotificação. O tratamento da TB resistente a medicamentos é complexo, prolongado e caro, frequentemente envolvendo fármacos com efeitos colaterais severos. A situação é agravada pela emergência da TB XDR, que limita ainda mais as opções terapêuticas viáveis (BRASIL, 2023).

Além da TB, observa-se um aumento preocupante de infecções por micobactérias não tuberculosas (MNTs), como *M. avium*, *M. kansasii* e *M. abscessus*, que também adquiriram alta resistência aos antibióticos convencionais. As estratégias terapêuticas para essas infecções são baseadas principalmente em antibióticos como macrolídeos, mas são limitadas pela baixa susceptibilidade das MNTs aos tratamentos disponíveis (SAXENA; SPAINK; FORN-CUNÍ, 2021).

Em resumo, a resistência bacteriana aos antibióticos representa uma séria ameaça à saúde global, com consequências significativas para o tratamento de doenças infecciosas. A persistência desse problema ressalta a necessidade urgente de novas estratégias para o uso racional de antibióticos e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- Akram, S. M.; ATTIA, F. N. Mycobacterium avium Complex. 2023. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; 2024 Jan-. PMID: 28613762.
- ALDANA-MEJIA, J. A.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; BASTOS, J. K. A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and Dalbergia ecastaphyllum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 198, p. 114029, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114029>
- ARMSTRONG, D. T.; EISEMANN, E.; PARRISH, N. A Brief Update on Mycobacterial Taxonomy, 2020 to 2022. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 61, n. 4, 2023. <https://doi.org/10.1128/jcm.00331-22>
- ASLAM, B. et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1-20, 2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- BACON, J.; WADDELL, S. J.; FLORES-VALDEZ, M. A. Biofilms in tuberculosis: What have we learnt in the past decade and what is still unexplored? **Tuberculosis**, v. 132, p. 102153, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102153>
- BARRETO-DUARTE, B.; ARAÚJO-PEREIRA, M.; NOGUEIRA, B. M. F.; SOBRAL, L.; RODRIGUES, M. M. S.; QUEIROZ, A. T. L. et al. Tuberculosis burden and determinants of treatment outcomes according to age in Brazil: a nationwide study of 896,314 cases reported between 2010 and 2019. **Frontiers in Medicine** (Lausanne), v. 8, p. 706689, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.706689>
- BARREIRO, E. J. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1-6, 2019. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190306>
- BOEING, T. et al. The gastroprotective effect of red propolis extract from Northeastern Brazil and the role of its isolated compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113623, mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113623>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Manual para o Controle da Tuberculose. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância da Tuberculose, Micoses Endêmicas e Micobactérias não Tuberculosas. Boletim epidemiológico, mar. 2023.
- BRASIL. Nota informativa nº 9/2021-cgdr/.dcci/svs/ms. v. 9, n. 0023125870, 2021.

CCANA-CCAPATINTA, G. V. et al. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2060, 28 abr. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25092060>

CHAKRABORTY, P. et al. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21748-6>

CHANDRA, P.; GRIGSBY, S. J.; PHILIPS, J. A. Immune evasion and provocation by *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 12, p. 750-766, 25 dez. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00763-4>

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; Vieira, I. C. G. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Norte. Brasília, DF: MMA, 2022. 1452p. (Série Biodiversidade, 53).

CORNARA, L. et al. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 28 jun. 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00412>

DA SILVA ARAÚJO, K. S. et al. Beekeeping in Brazil: A Bibliographic Review. **Beekeeping-New Challenges**, 2018. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76953>

DANTAS SILVA, R. P. et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One**, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>

DAS NEVES, M. V. M. et al. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.009>

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem057>

DE LA FUENTE-NUNEZ, C.; Cesaro, A.; Hancock, R. E. W. Antibiotic failure: Beyond antimicrobial resistance. *Drug Resistance Updates*, v. 71, n. July, p. 101012, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.101012>

DE OLIVEIRA REIS, J. H. et al. Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil. *PLoS ONE*, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219063>

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. *Journal of Apicultural Research*, 2018. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1412563>

FORBES, B. A. *Mycobacterial taxonomy*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 2, p. 380-383, 2017. <https://doi.org/10.1128/JCM.01287-16>

FREIRES, I. A.; De Alencar, S. M.; Rosalen, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 110, p. 267-279, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>

FURIN, J.; Cox, H.; Pai, M. Tuberculosis. *The Lancet*, v. 393, n. 10181, p. 1642-1656, 2019. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3)

GAGNEUX, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 202-213, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>

HE, Y. et al. New perspectives on the treatment of mycobacterial infections using antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 10, p. 4197-4209, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10513-2>

HOLZHEIMER, M.; Buter, J.; Minnaard, A. J. Chemical Synthesis of Cell Wall Constituents of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical Reviews*, v. 121, n. 15, p. 9554-9643, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00043>

HOOK, E. B. Latent Tuberculosis Infection. *New England Journal of Medicine*, v. 386, n. 13, p. e33, 31 mar. 2022. doi:10.1056/NEJMc2200195. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2200195>

JACOBO-DELGADO, Y. M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? *Frontiers in Immunology*, v. 14, n. May, p. 1-18, 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1194923>

JOHNSON, T. M.; Byrd, T. F.; DRUMMOND, W. K.; CHILDS-KEAN, L. M.; MAHONEY, M. V.; PEARSON, J. C.; Rivera, C. G. Contemporary Pharmacotherapies for Nontuberculosis Mycobacterial Infections: A Narrative Review. *Infectious Diseases and Therapy*, v. 12, n. 2, p. 343-365, fev. 2023. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00750-5>

JOHANSEN, M. D.; HERRMANN, J. L.; KREMER, L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 18, n. 7, p. 392-407, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>

KIM, J. K.; PARK, S. U. Recent studies on kaempferol and its biological and pharmacological activities. *EXCLI Journal*, 2020. <http://dx.doi.org/10.17179/excli2020-2162>

KITAMURA, H. et al. Brazilian propolis ethanol extract and its component kaempferol induce myeloid-derived suppressor cells from macrophages of mice in vivo and in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 18, n. 1, p. 138, 2 dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2198-5>

KOCH, A.; MIZRAHI, V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, v. 26, n. 6, p. 555-556, jun. 2018. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.012. Epub 2018 Mar 23. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.012>

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Propolis: A new frontier for wound healing? *Burns and Trauma*, 2015. <https://doi.org/10.1186/s41038-015-0010-z>

- MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sciences*, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.006>
- MEEHAN, C. J. et al. Reconstituting the genus mycobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 71, n. 9, 2021. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004922>
- MIGLIORE, L. J.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; CURLETTI, G. et al. A new species of jewel beetle (Coleoptera, Buprestidae, Agrilus) triggers the production of the Brazilian red propolis. *Scientific Natural*, v. 109, p. 18, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01785-x>
- MOISE, A. R.; BOBIŞ, O. *Baccharis dracunculifolia* and *Dalbergia ecastophyllum*, main plant sources for bioactive properties in green and red Brazilian propolis. *Plants*, v. 9, n. 11, p. 1619, 21 nov. 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9111619>
- NANI, B. D. et al. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. *Phytotherapy Research*, 2018. <https://doi.org/10.1002/ptr.6016>
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- NIÑO-PADILLA, E. I.; VELAZQUEZ, C.; GARIBAY-ESCOBAR, A. Mycobacterial biofilms as players in human infections: a review. *Biofouling*, v. 37, n. 4, p. 410–432, 2021. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1925886>
- NQWATA, L.; OUÉDRAGO, A. R. Non-tuberculous mycobacteria pulmonary disease: A review of trends, risk factors, diagnosis and management. *African Journal of Thoracic and Critical Care Medicine*, v. 28, n. 2, p. 82–86, 2022. <https://doi.org/10.7196/AJTCCM.2022.v28i2.157>
- OJHA, A. K. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular Microbiology*, v. 69, p. 164–174, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x>
- PEREIRA, D. S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 11, n. 2, p. 1–21, 2015. <https://doi.org/10.30969/acsa.v11i2.652>
- RAMÍREZ-RENDON, D. et al. Impact of novel microbial secondary metabolites on the pharma industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11821-5>
- REFAAT, H. et al. Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. 2020. *International Journal of Pharmaceutics* v. 592, 5 January 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120028>
- REGUEIRA, M. S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, v. 107, p. 572–580, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.052>

RICHARDS, J. P.; OJHA, A. K. Mycobacterial biofilms. *Microbiology Spectrum*, v. 2, n. 5, 19 set. 2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0004-2013>

ROCA, I.; AKOVA, M.; BAQUERO, F. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect.*, v. 6, p. 22–29, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>

RUFATTO, L. C. et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiological Research*, v. 214, n. May, p. 74–82, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.003>

SADERI, L.; PUCI, M.; DI LORENZO, B. et al. Rapid diagnosis of XDR and pre-XDR TB: A systematic review of available tools. *Archives of Bronconeumology*, v. 58, n. 12, p. 809-820, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2022.07.012>

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis? *Apidologie*, v. 52, n. 6, p. 1075–1097, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00889-z>

SALEHI, A.; HOSSEINI, S. M.; KAZEMI, S. Antioxidant and anticarcinogenic potentials of propolis for dimethylhydrazine-induced colorectal cancer in Wistar rats. *BioMed Research International*, v. 2022, p. 1–12, 23 jun. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8497562>

SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M. et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 10, p. 608-620, out. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>

SAXENA, S.; SPAINK, H. P.; FORN-CUNÍ, G. Drug resistance in nontuberculous mycobacteria: Mechanisms and models. *Biology*, v. 10, n. 2, p. 1–22, 2021. <https://doi.org/10.3390/biology10020096>

ŞENEL, E.; DEMIR, E. Bibliometric and scientometric analysis of the articles published in the *Journal of Religion and Health* between 1975 and 2016. *Journal of Religion and Health*, v. 57, p. 1473–1482, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10943-017-0539-1>

SFORCIN, J. M. et al. Apiterapia: medicamentos das abelhas e possíveis tratamentos. Editora UNESP, 2022. <https://doi.org/10.7476/9786557142974>

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 5, n. 3, p. 313–316, 2008. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem059>

TURENNE, C. Y. Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 72, p. 159-168, ago. 2019. doi: 10.1016/j.meegid.2019.01.017. Epub 2019. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.017>

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel006>

TÜKENMEZ, H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* virulence inhibitors discovered by *Mycobacterium marinum* high-throughput screening. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37176-4>

VIDAL, M. F. Potencial da produção de própolis no Nordeste. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, v. 6, n. 153 (2021). Caderno Setorial ETENE. Fortaleza, v. 6, 2024. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/revista/cse/article/view/27>

WANG, W. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, v. 11, p. 1645–1658, 2018. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The End TB Strategy. *The End TB Strategy*, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Geneva: WHO, 2013.

ZHA, B. S.; NAHID, P. Treatment of drug-susceptible tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, v. 40, n. 4, p. 763–774, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.07.006>

CAPÍTULO II

Brazilian Red Propolis against Mycobacteria: In vitro assessment of antibacterial potential, synergistic activity, biofilm inhibition, and intramacrophage action

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico *Molecules* em 2024

Article

Brazilian Red Propolis against Mycobacteria: *In vitro* assessment of antibacterial potential, synergistic activity, biofilm inhibition, and intramacrophage action

Sharlles Batista Martins¹, Samuel Cota Teixeira², Guilherme de Souza², Sérgio Ricardo Ambrósio³, Thayná de Souza Silva³, Jairo Kenupp Bastos⁴, Matheus Hikaru Tanimoto⁴, Bellisa de Freitas Barbosa², Eloisa Amália Vieira Ferro², and Carlos Henrique Gomes Martins^{1,*}

¹ Laboratory of Antimicrobial Testing, Institute of Biomedical Science, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, 38405318, Minas Gerais, Brazil

² Laboratory of Immunophysiology of Reproduction, Institute of Biomedical Science, Federal University of Uberlândia, Uberlândia 38405318, MG, Brazil

³ Nucleus of Research in Technological and Exact Sciences, University of Franca, Franca, 14404600, São Paulo, Brazil

⁴ School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 14040900, São Paulo, Brazil

* Correspondence: carlos.martins2@ufu.br; Tel.: +55-343-239-1363

Abstract: Tuberculosis remains a significant global health concern, being the primary cause of death from infectious diseases. Controlling the disease is challenging, particularly with the rise of drug-resistant strains. Additionally, non-tuberculous mycobacteria are increasingly causing infections, with limited treatment options available. Brazilian red propolis (BRP) has attracted attention due to its potential antibacterial properties, but its efficacy against *Mycobacterium* is largely unexplored. This study aimed to assess the *in vitro* antimycobacterial potential of BRP's crude hydroalcoholic extract (CHEBRP), both alone and in association with standard antibiotics. The investigation included determining the Minimum Inhibitory Concentration and Fractional Inhibitory Concentration Index, assessing the inhibition of biofilm formation, evaluating cytotoxicity in Raw 264.7 macrophages, and testing efficacy against intracellular bacilli. CHEBRP showed significant activity against most tested strains, notably against rifampicin-resistant *M. tuberculosis*. Administering it alongside isoniazid and rifampicin had an indifferent effect, suggesting that its co-administration is feasible, as, in addition to the synergistic action, propolis may offer additional benefits, such as modulation of the immune response. Furthermore, CHEBRP inhibited mycobacterial biofilm formation, demonstrated low cytotoxicity, and effectively eradicated intramacrophage bacilli. In conclusion, CHEBRP exhibits promising antimycobacterial activity, warranting further research to evaluate its *in vivo* effects and efficacy against *Mycobacterium* species.

Keywords: *Mycobacterium*; Brazilian red propolis; antibacterial activity

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Currently, there are more than 190 recognized species of *Mycobacterium*, the only genus in the *Mycobacteriaceae* family, which mostly comprises saprophytic microorganisms found in water and soil. However, some strains are of public health interest because they cause tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* Complex), and others, classified as non-tuberculous mycobacteria (NTM) or atypical, are associated with pulmonary, cutaneous, and disseminated infections, especially in immunocompromised individuals [1, 2].

Mycobacteria have a peculiar cell wall composed of arabinogalactan and long-chain branched fatty acids called mycolic acids, which confer the property of alcohol-acid resistance observed by Ziehl-Neelsen staining [3]. Moreover, this structure is related to the survival of bacteria inside macrophages [4], with mechanisms of resistance to antibiotics and the ability to aggregate bacteria and form biofilms, which significantly contribute to pathogenicity and increased virulence [5].

Indeed, more than 140 years have passed since the German bacteriologist Robert Koch identified *Mycobacterium tuberculosis* as the etiological agent of tuberculosis [6], and the disease, one of the oldest and deadliest in humanity, still represents a serious challenge for health systems [7].

Proof of this is that in 1993, tuberculosis (TB) was considered by the World Health Organization (WHO) as a global public health emergency. Another milestone related to the disease was the year 2014, when the World Health Assembly promulgated coping strategies and approved a document called The End TB Strategy, whose goal would be a 95% reduction in the global incidence of the disease by 2035 [8].

Despite all the effort employed and TB being a treatable and curable disease, the number of deaths has risen again in Brazil and worldwide in 2022. Updated data from the WHO reveal that the disease occupies the thirteenth position in general causes of death and the second in deaths from infectious diseases, only behind COVID-19 [9].

In Brazil, the basic treatment recommended for adults and adolescents is carried out for six months with the administration of four first-line drugs such as isoniazid, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide, and the scheme seeks to obtain rapid bactericidal activity, prevent the emergence of microbial resistance, and eliminate all bacilli, whether in pulmonary cavities, inside closed caseous lesions, or inside macrophages [10].

However, it should be noted that, in recent decades, the inadequate or incomplete use of medications has contributed to the selection of mutant bacilli resistant to antituberculosis agents, which represents a serious threat to attempts to control the disease worldwide [11]. It has already been reported that, for drugs such as bedaquiline and delamanid, last approved by the Federal Drug Administration (FDA), resistant strains have also been isolated [12].

Similarly, infections caused by NTM species such as *M. avium* and *M. kansasii*, considered opportunistic and emerging pathogens in various parts of the world, are difficult to treat and may not respond to medications. Moreover, their ability to form biofilms and their persistence in water systems, pipes, instruments, and hospital equipment constitute important sources of contamination [13].

Thus, faced with so many challenges and in the search for treatment alternatives, contemporary science has sought solutions in nature and concentrated efforts on the study of bioactive principles derived from natural products. In this logic, propolis has gained notoriety in recent times in various parts of the world, and this can be evidenced by the growing number of publications on its chemical composition and biological properties [14, 15].

Propolis is a substance produced by bees from resins, gums, and balsams collected from plants, mixed with salivary secretions, wax, and pollen. The extraction process with hydroalcoholic solvents allows for obtaining a crude extract whose characteristics, such as aroma, color, and flavor, vary according to the botanical origin and concentration of soluble elements [16].

More than 300 compounds from different types of propolis have already been isolated, especially flavonoids, terpenes, and terpenoids [17], and many of them have proven biological activities. Thus, there are many publications demonstrating the antibacterial [18], antioxidant [19], antiparasitic [20], antifungal [21], antiviral [22], antitumor [23], and immunomodulatory [24] potential of propolis, which can even act synergistically and intensify the action of other drugs commonly used in medical practice [25].

According to the chemical composition, physical aspects, and regions of the country where they are found, Brazilian propolis was divided into twelve classes [26] until,

in 2007, independent works [27, 28] chemically characterized a new type, Brazilian red propolis (BRP), while another group identified its main botanical origin as being *Dalbergia ecastaphyllum*, whose occurrence occurs especially in the mangroves of the Northeast region of Brazil [29].

Recently, phytochemical and chromatographic analyses confirmed that *Symphonia globulifera* L.f. (Clusiaceae) is also a secondary plant source, contributing a variety of chemical constituents to the composition of BRP, mainly polyprenylated benzophenones [30].

The antibacterial potential of BRP, attributed to the flavonoids that constitute it (mainly isoflavonoids and prenylated benzophenones), has already been confirmed against various types of bacteria [31, 32] however, the search in databases for articles related to the antibacterial potential of the product against the genus *Mycobacterium* revealed an absence of studies in this area.

Given the above, the importance of discovering new drugs with antimycobacterial capacity is clear, and BRP, being composed of substances with great antibacterial potential already demonstrated in studies involving other genera of bacteria, has stood out in this sense [33]. However, as already mentioned, no works have been found to date in the databases searched that demonstrate, specifically, whether the crude hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis (CHEBRP) has activity against mycobacteria.

This study aimed to investigate the antimycobacterial activity of CHEBRP against planktonic cells and its ability to inhibit, in vitro, biofilm formation in mycobacterial species. Furthermore, it was assessed whether CHEBRP presents synergistic activity with reference antimycobacterial agents. In addition, considering the immune evasion mechanisms developed by mycobacteria that allow them to survive within macrophages, this study aimed to evaluate the ability of CHEBRP to combat intracellular bacilli. The focus was to contribute information for the development of new therapeutic agents derived from natural products, which may present new mechanisms of action and be associated with fewer adverse effects compared to synthetic drugs.

2. Results

2.1. Evaluation of in vitro antimycobacterial activity and synergistic effects

The antimycobacterial activity of CHEBRP was assessed both individually and in combination with the reference antibiotics isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) by determining the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and employing the Fractional Inhibitory Concentration (checkerboard assay), respectively. The MIC values of CHEBRP ranged from 31.25 µg/mL to 250 µg/mL. The best results were observed against *M. tuberculosis* strains: H37Rv (ATCC 27294) and a clinical isolate, both with MIC of 62.5 µg/mL. Notably, the rifampicin-resistant strain (TB RR) showed the lowest MIC among the tested mycobacteria (31.25 µg/mL). Regarding *M. avium* (ATCC 25291) and a clinical isolate, both exhibited identical MICs of 250 µg/mL, as did *M. kansasii* (ATCC 12478) and a clinical isolate, with MIC values of 125 µg/mL. The minimum inhibitory concentrations of CHEBRP and antibiotics are shown in Table 1.

Table 1 - MIC ($\mu\text{g/mL}$) results of CHEBRP, INH and RIF against mycobacteria

Strains	CHEBRP	INH	RIF
<i>M. avium</i> (ATCC 25291)	250	> 1.0	0.06
<i>M. avium</i> (Clinical Isolate)	250	0.25	0.03
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	125	0.5	0.125
<i>M. kansasii</i> (Clinical Isolate)	125	0.5	0.125
<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294)	62.5	0.25	0.06
<i>M. tuberculosis</i> (Clinical Isolate)	62.5	0.5	0.06
<i>M. tuberculosis</i> RR (Clinical Isolate)	31.25	0.06	> 200

MIC - Minimum Inhibitory Concentration; ATCC - American Type Culture Collection; CHEBRP – Crude Hydroalcoholic Extract of Brazilian Red Propolis; INH – isoniazid; RIF – rifampicin; RR - rifampicin-resistant.

The results obtained for the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) after evaluating the interaction between CHEBRP and the antibiotic INH, as demonstrated in Table 2, revealed values ranging from 2.0 to 4.0. These data did not show synergistic or antagonistic effects, meaning the association was indifferent to the tested mycobacterial strains.

Table 2 - Determination of the synergistic activity of the CHEBRP in combination with INH against *Mycobacterium* strains

Strains	MIC alone ($\mu\text{g/mL}$)		MIC combined ($\mu\text{g/mL}$)		FIC		FICI	Outcome
	CHEBRP	INH	CHEBRP	INH	CHEBRP	INH		
<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294)	62.5	0.25	62.5	0.25	1.0	1.0	2.0	indifferent
<i>M. tuberculosis</i> (Clinical Isolate)	62.5	0.5	62.5	0.5	1.0	1.0	2.0	indifferent
<i>M. tuberculosis</i> RR (Clinical Isolate)	31.25	0.06	62.5	0.03	2.0	0.5	2.5	indifferent
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	125	0.5	250	1.0	2.0	2.0	4.0	indifferent
<i>M. kansasii</i> (Clinical Isolate)	125	0.5	125	1.0	1.0	2.0	3.0	indifferent

MIC - Minimum Inhibitory Concentration; ATCC - American Type Culture Collection; CHEBRP – Crude Hydroalcoholic Extract of Brazilian Red Propolis; INH – isoniazid; RR - rifampicin-resistant; FIC – Fractional Inhibitory Concentration; FICI - Fractional Inhibitory Concentration Index.

Similarly, for the antibiotic RIF, the FICI results indicated that the interaction with CHEBRP resulted in indifferent effects, with values ranging between 1.5 and 4.0, as shown in Table 3. In the case of the *M. tuberculosis* RR strain, known to be resistant to RIF, no synergy test was conducted with this antibiotic.

Table 3 - Determination of the synergistic activity of the CHEBRP in combination with RIF against *Mycobacterium* strains

Strains	MIC alone		MIC combined		FIC		FICI	Outcome
	(µg/mL)		(µg/mL)					
	CHEBRP	RIF	CHEBRP	RIF	CHEBRP	RIF		
<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294)	62.5	0.06	62.5	0.03	1.0	0.5	1.5	indifferent
<i>M. tuberculosis</i> (Clinical Isolate)	62.5	0.06	62.5	0.06	1.0	2.0	2.0	indifferent
<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)	125	0.12	250	0.24	2.0	2.0	4.0	indifferent
<i>M. kansasii</i> (Clinical Isolate)	125	0.12	250	0.06	2.0	0.5	2.5	indifferent

MIC - Minimum Inhibitory Concentration; ATCC - American Type Culture Collection; CHEBRP – Crude Hydroalcoholic Extract of Brazilian Red Propolis; RIF – rifampicin; FIC – Fractional Inhibitory Concentration; FICI - Fractional Inhibitory Concentration Index.

2.2. Inhibition of biofilm formation

The antibiofilm activity of CHEBRP and INH, utilized as the control antibiotic, was evaluated by assessing the reduction in biomass. This evaluation involved determining the MIC_{B50}, which represents the lowest concentration of antimycobacterial agents that exhibited 50% or more inhibition of biofilm formation. Additionally, a cell viability test was conducted using MTT. Overall, for all analyzed mycobacteria, significant reductions in the biomass of monospecies biofilms were observed compared to untreated controls. For *M. tuberculosis* ATCC and clinical isolate, the MIC_{B50} of CHEBRP, with a value of 62.5 µg/mL, coincided with the MIC results obtained for planktonic cells and decreased the biomass amount by 60.6% and 59.6%, respectively. The MIC_{B50} values for *M. tuberculosis* RR, *M. kansasii* ATCC, and clinical isolate of *M. kansasii* were 125, 500, and 250 µg/mL, respectively. These values, along with the other concentrations of CHEBRP and their corresponding percentages of inhibition of mycobacterial biofilm formation determined through the crystal violet biomass determination test, are presented in Table 4. The MIC_{B50} values were highlighted with stripes for easier identification.

Table 4 – CHEBRP concentrations and their inhibitory effectiveness (%) on mycobacterial biofilm formation

<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294)		<i>M. tuberculosis</i> Clinical Isolate		<i>M. tuberculosis</i> RR Clinical Isolate		<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)		<i>M. kansasii</i> Clinical Isolate	
(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)
31.25	49.50	31.25	34.76	31.25	29.28	31.25	36.97	31.25	45.14
*62.5	60.58	*62.5	59.63	62.5	45.22	62.5	38.62	62.5	47.78
125	61.66	125	61.61	*125	66.93	125	48.88	125	49.88
250	61.90	250	68.39	250	71.60	250	49.05	*250	76.98
500	66.0	500	69.50	500	72.95	*500	72.84	500	78.67
1000	69.25	1000	71.38	1000	75.55	1000	76.62	1000	83.03
2000	70.72	2000	73.10	2000	78.02	2000	79.00	2000	84.62

CHEBRP – Crude Hydroalcoholic Extract of Brazilian Red Propolis; ATCC - American Type Culture Collection; RR - rifampicin-resistant. The highlighted concentrations (*) correspond to MIC_{B50}.

Isoniazid, a crucial drug in the treatment of tuberculosis and other mycobacterial infections, demonstrated a high capacity for inhibition *in vitro* of biofilm formation and reduction of bacterial metabolism across all strains, even at the lowest concentrations employed in the assays. For *M. tuberculosis* ATCC and TB RR, the MIC_{B50} values were 0.06 µg/mL, with a reduction in biomass of 59.7% and 63.6%, respectively. The MIC_{B50} values for clinical isolate strain of *M. tuberculosis*, *M. kansasii* ATCC, and clinical isolate of *M. kansasii* were 0.5, 0.015, and 0.125 µg/mL, with percentages of biofilm formation inhibition of 68.5%, 55.0%, and 68.0%, respectively, compared to untreated controls. These data, along with the remaining inhibition percentages obtained at other concentrations, are available in Table 5.

Table 5 - INH concentrations and their inhibitory effectiveness (%) on mycobacterial biofilm formation

<i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294)		<i>M. tuberculosis</i> Clinical Isolate		<i>M. tuberculosis</i> RR Clinical Isolate		<i>M. kansasii</i> (ATCC 12478)		<i>M. kansasii</i> Clinical Isolate	
(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)
0.015	46.14	0.015	20.53	0.015	33.83	*0.015	55.03	0.015	40.61
0.03	46.84	0.03	31.29	0.03	48.91	0.03	64.85	0.03	47.94
*0.06	59.72	0.06	39.47	*0.06	63.61	0.06	76.17	0.06	48.40
0.125	70.91	0.125	47.51	0.125	78.87	0.125	81.19	*0.125	68.03
0.25	74.51	0.25	48.87	0.25	83.29	0.25	82.41	0.25	70.50
0.5	81.16	*0.5	68.53	0.5	85.99	0.5	83.80	0.5	73.11
1.0	95.30	1.0	86.33	1.0	88.75	1.0	84.63	1.0	86.99

INH – isoniazid; ATCC - American Type Culture Collection; RR - rifampicin-resistant. The highlighted concentrations (*) correspond to MIC_{B50}.

Concomitantly with the reduction in biomass, the MTT viability assay demonstrated that both CHEBRP and INH exhibited significant and dose-dependent inhibitions in the metabolism of mycobacteria within the biofilms. These correlations can be observed in Figure 1 and Figure 2.

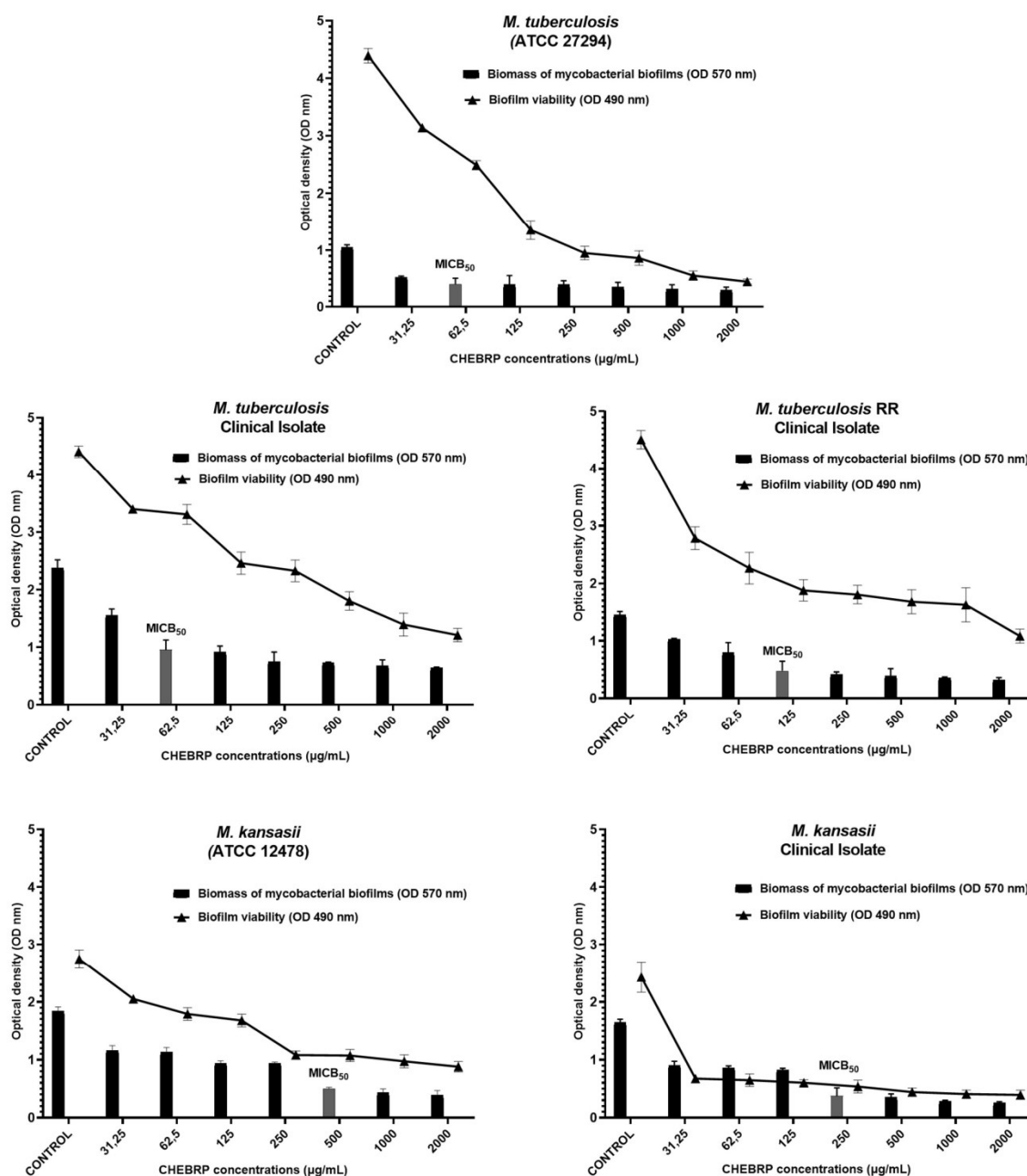


Figure 1 - CHEBRP Biofilm Inhibition. Relation between biomass reduction (Crystal Violet) and bacterial viability (MTT) in biofilms of *M. tuberculosis* and *M. kansasii* ATCC and Clinical Isolates. The mycobacteria were treated with serial dilutions of CHEBRP (ranging from 31.25 to 2000 $\mu\text{g/mL}$). The control group corresponds to microorganisms incubated only with culture medium. Results were expressed as optical density (OD). The bars corresponding to the MIC₅₀ values are highlighted. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation from experiments performed in triplicate. RR - rifampicin-resistant

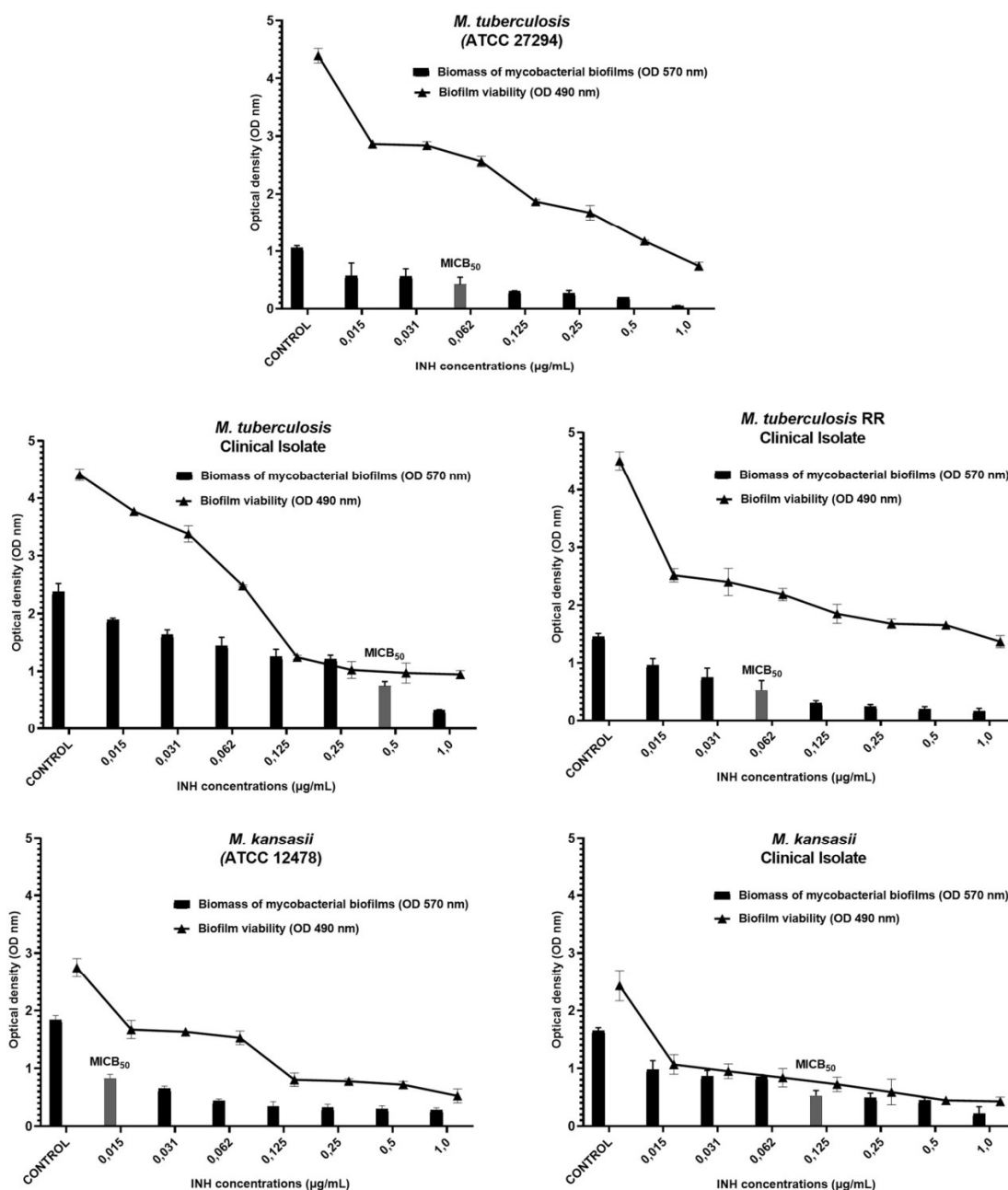


Figure 2 - INH Biofilm Inhibition. Relation between biomass reduction (Crystal Violet) and bacterial viability (MTT) in biofilms of *M. tuberculosis* and *M. kansasii* ATCC and Clinical Isolates. The mycobacteria were treated with serial dilutions of INH ranging from 0.015 to 1.0 μg/mL. The control group corresponds to microorganisms incubated only with culture medium. Results were expressed as optical density (OD). The bars corresponding to the MIC₅₀ values are highlighted. Data are presented as mean ± standard deviation from experiments performed in triplicate. RR – rifampicin-resistant

2.3. Cytotoxicity test

Before evaluating the intramacrophage inhibition capacity of CHEBRP, a cytotoxicity assay was conducted using murine macrophages (Raw 264.7 lineage). The cells were exposed to CHEBRP at different concentrations (4–512 $\mu\text{g/mL}$), as well as the standard antibiotic, INH, at various concentrations (0.19–25 $\mu\text{g/mL}$).

As evidenced in Figure 3A, CHEBRP demonstrated cytotoxicity to macrophages at the four highest concentrations tested (64 to 512 $\mu\text{g/mL}$), while no significant reductions in cell viability were observed at other concentrations compared to the control. This pattern was also observed at the two concentrations of DMSO used (0.6 and 1.2%) and at all concentrations of the antibiotic INH, as illustrated in Figure 3B.

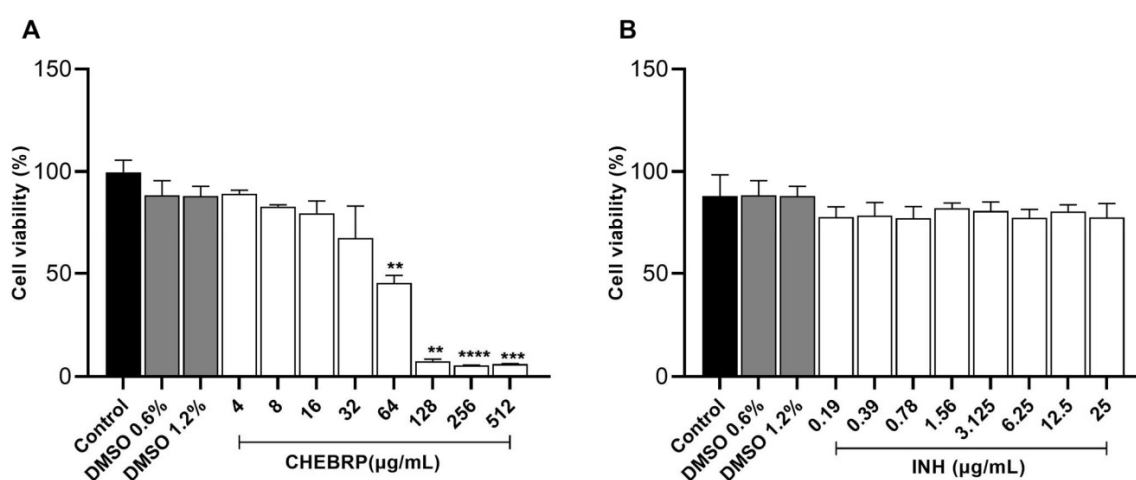


Figure 3 - Cell viability by MTT. Raw 264.7 cells were treated for 72 hours in twofold serial dilutions ranging from 4.0 to 512 $\mu\text{g/mL}$ for CHEBRP (A) and from 0.19 to 25 $\mu\text{g/mL}$ for INH (B). Raw 264.7 cells were treated with culture medium only (control group) and DMSO at 0.6 and 1.2% which are the percentages of solvent used in highest CHEBRP concentrations (256 and 512 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Cell viability was expressed in percentage (cell viability %), with the absorbance of cells incubated only with culture medium considered as 100% viability. Data are expressed as means $\pm$ standard deviation of experiments performed in eight replicates. Significant differences detected by the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test are labeled (statistically significant when $P < 0.05$).

2.4. Intracellular anti-mycobacterial activity

The results of the assessment of intramacrophage activity of CHEBRP through luminescence testing demonstrated a remarkable capacity for intracellular elimination of this substance in both strains of *M. tuberculosis* evaluated and at both concentrations tested for each. The efficacy of the red propolis extract against the ATCC strain was significantly superior to that of INH, especially at the concentration of 62.5 $\mu\text{g/mL}$, equivalent to its MIC (Figure 4A). Meanwhile, the inhibitory activity of CHEBRP against *M. tuberculosis* TB RR was comparable to that of the control drug, with both showing significant inhibition (Figure 4B).

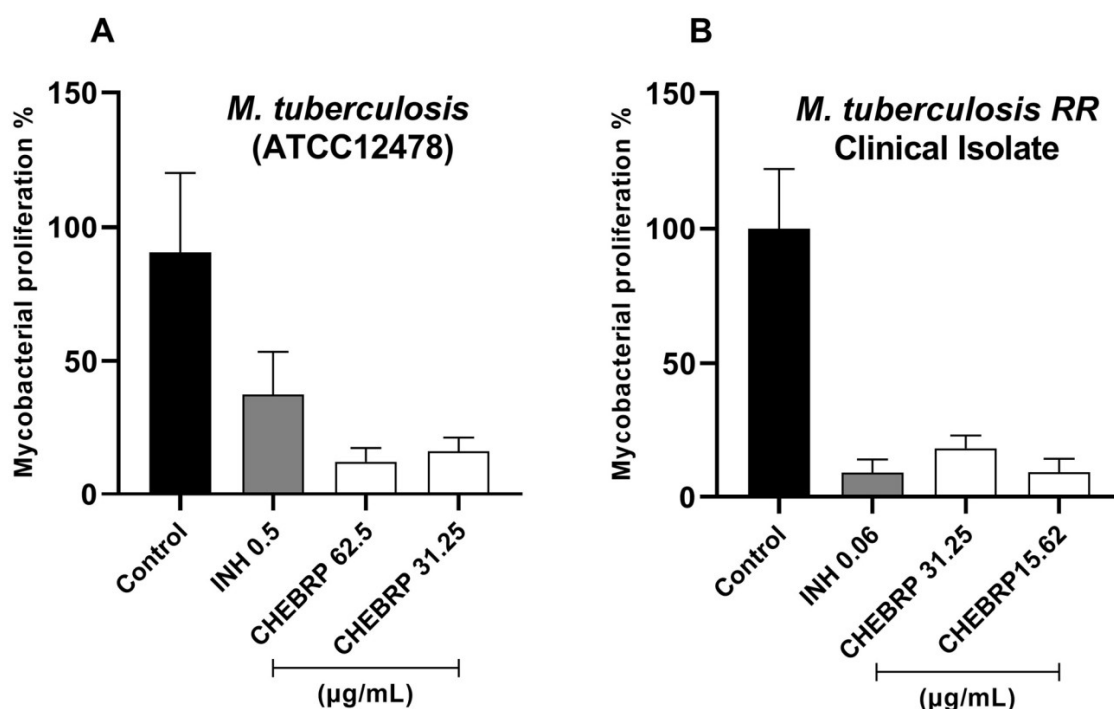


Figure 4 – Intracellular Activity of CHEBRP in Raw 264.7 Cells Infected with *M. tuberculosis* ATCC (A) and TB RR (B). Raw 264.7 cells were infected (MOI 1:10), treated for 72 h with CHEBRP and INH at concentrations corresponding to the MIC and ½ MIC obtained from each strain. After 3 days, macrophages were lysed, and mycobacterial viability was determined using the BacTiter-Glo™ luminescence assay and expressed as a percentage (mycobacterial proliferation %), with luminescence from untreated infected cells considered as 100% viability (Control). Data are expressed as means ± standard deviation of experiments performed in six replicates. Significant differences detected by the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test are labeled (statistically significant when $P < 0.05$).

3. Discussion

MIC assays are valuable for evaluating the antibacterial activity of natural products, although standardization challenges persist [34]. In this study, MIC of CHEBRP and control antibiotics were determined using the microdilution method in broth, as per CLSI M24S guidelines [35], and visually read after resazurin staining, following the Resazurin Microtiter Assay Plate (REMA) protocol [36].

Interpretations of the antibacterial potential of natural products vary widely. For instance, one group interpreted MIC values according to the following criteria: results below 100 μg/mL were considered to have good antimicrobial activity; between 100 and 500 μg/mL, moderate activity; between 500 and 1000 μg/mL, weak activity; and MIC values greater than 1000 μg/mL were considered inactive [37]. On the other hand, some researchers accept MIC ≤ 200 μg/mL as indicative of good activity, especially concerning *M. tuberculosis* [38, 39], while for another group, alcoholic plant extracts with MIC values ≤ 512 μg/mL show promise for the development of antituberculosis compounds [40].

Considering these references and comparing them with the results of this study, it is clear that CHEBRP demonstrated an overall satisfactory performance, with MIC values ranging from 31.25 μg/mL to 250 μg/mL. This highlights its promising potential for the

development of antimycobacterial compounds, particularly notable in *M. tuberculosis* strains.

The literature highlights the broad antibacterial spectrum of Brazilian red propolis (BRP) against various species [41], but specific studies on its activity against the genus *Mycobacterium* were not found in the consulted databases. Our study fills this gap by providing preliminary data to understand the potential of BRP as a natural product deserving exploration for the development of new drugs capable of combating infections caused by mycobacteria.

Propolis and its derivatives contain a variety of chemical compounds, such as polyphenols, flavonoids, and fatty acids, which have demonstrated efficacy against various microorganisms. These compounds can act in several ways, including damaging the bacterial membrane or cell wall, inhibiting cell division, reducing energy supply, altering membrane potential, and modulating the immune system [42]. Due to the growing interest in their medicinal properties, studies have documented significant interactions between propolis extracts and drugs, which can result in substantial benefits or potential clinical risks, depending on whether the effects manifest synergistically or antagonistically [43].

The synergistic effect of CHEBRP was evaluated in combination with the antibiotics INH or RIF, reference drugs indicated for all forms of tuberculosis, including new, advanced, and chronic cases. The results of the associations between the red propolis extract and the drugs were indifferent. The obtained FICI values revealed that the mechanism of action of one compound did not interfere with enhancing or diminishing the effect of the other.

Although no increase in the effectiveness of the evaluated antituberculosis agents was identified when combined with CHEBRP, the results obtained in this study are relevant because simultaneous use of propolis with other drugs may have benefits beyond synergistic action. *In vivo* studies have demonstrated that the coadministration of propolis and cefixime resulted in significant improvements in the overall condition of mice infected with *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium*. This treatment modulated the immune system, leading to a reduction in bacterial load, an increased survival rate, normalization of hematological parameters, and reduced toxicity in the kidneys, spleen, and liver. The protective effect on organs was attributed to propolis and its remarkable antioxidant and free radical-neutralizing properties, corroborating that the effects of propolis extend beyond synergistic action with antibiotics [44, 45].

However, it is important to emphasize that the effects observed were only *in vitro* models, highlighting the need to confirm these results through animal studies or clinical trials in humans to determine the real effectiveness of the combination of CHEBRP with antibiotics.

In addition to investigating the antimycobacterial potential of CHEBRP alone and in combination with antibiotics against planktonic cells, this study also evaluated its ability to inhibit, *in vitro*, biofilm formation. This assessment is relevant because cells within biofilms represent an adaptation to stress, exhibiting specific genetic and protein profiles that confer upon microorganisms the ability to survive in adverse conditions, including the presence of antibiotics. Studies have demonstrated that biofilms present an adaptive resistance to most antibiotics, being up to a thousand times more effective than their planktonic forms [46, 47].

Moreover, these biofilms can circumvent host defense mechanisms, contributing to their ability to persist and cause chronic infections such as tuberculosis and those caused by NTM. Thus, biofilms formed by mycobacteria are the subject of intense research in microbiology due to their unique and significant characteristics, both in clinical and environmental contexts [48, 49].

Antibiofilm substances can have preventive effects, avoiding biofilm formation, or therapeutic effects, acting on established biofilms. CHEBRP demonstrated this efficacy by

reducing the biomass of mycobacterial biofilms from the strains used in this study. Additionally, the MTT assay revealed that both CHEBRP and the antibiotic INH were effective in reducing the viability of mycobacteria in biofilms compared to the untreated group. Further studies indicate that early treatment of biofilms is more effective due to the cells' lesser adaptation to the environment. Innovative strategies are being investigated to improve the treatment of mycobacterial infections, considering the differences in biofilm development among species [50]. In this regard, our results contribute significantly to this field.

Our study also aimed to explore the anti-tuberculosis potential of CHEBRP against the intracellular bacilli of *M. tuberculosis*, considering their ability to replicate and persist within macrophages, which protects them from certain antibiotics. Before proceeding, it was crucial to assess whether the lowest concentrations of the extract capable of inhibiting the growth of each strain were not toxic to the Raw 264.7 cells used, a widely recognized *in vitro* model for investigating the biological functions of macrophages.

Researchers identified toxicity only at concentrations above 80 µg/mL in the same cell line [51]. This finding supports the cytotoxicity analysis in this study, where only concentrations above 64 µg/mL showed a significant reduction in the viability of Raw 264.7 cells, indicating low toxicity of CHEBRP for this cell line. Regarding the cytotoxicity test, it is important to mention that control wells containing DMSO were included to rule out the possibility of cytotoxicity related to this substance, which is used as a solvent for the extract. It is noteworthy that at both DMSO concentrations of 1.2% and 0.6%, present in the highest concentrations of CHEBRP at 512 and 256 µg/mL, respectively, the observed cytotoxicity was exclusively attributed to propolis and not to the solvent used. Finally, the assessment of CHEBRP cytotoxicity through the MTT colorimetric method was of great importance, as it contributes to the selection of appropriate concentrations in future experimental studies involving Raw 264.7 cells.

Our bioluminescence assay results, which utilizes firefly luciferase to emit light in the presence of the luciferin/ATP combination and serves as a sensitive indicator of bacterial cell viability, revealed that CHEBRP demonstrated significant efficacy in eradicating intramacrophage bacilli in both strains of *M. tuberculosis* tested. These results were comparable or even superior to those observed with the antibiotic INH, known for its ability to penetrate membranes and act within phagocytic cells.

Over the years, studies have explored the effects of propolis on the immune system through various experimental approaches, highlighting its ability to modulate the function of several cells involved in innate and adaptive immunity, such as macrophages, monocytes, neutrophils, natural killer cells (NK), dendritic cells, and lymphocytes, enhancing their activity and mechanisms for combating infectious agents [52]. It has been demonstrated that propolis stimulated the generation of reactive oxygen species (ROS), the expression of toll-like receptors (TLR-2 and TLR-4), and the production of pro-inflammatory cytokines by murine macrophages, as well as increasing the fungicidal and bactericidal activity of these cells, suggesting that the product may activate mechanisms to eliminate microorganisms [53].

Moreover, it is noteworthy that an investigation into the effects of propolis produced in Brazil, Cuba, and Mexico showed that samples with varied chemical compositions exhibited distinct activities, potentially showing either pro or anti-inflammatory action, suggesting a relationship with differences in their botanical sources [54].

Therefore, based on this information and the results observed in this study, we can conclude that the activity against *M. tuberculosis* harbored within Raw 264.7 cells can be attributed to both the internalization and direct action of CHEBRP and the activation of macrophages by the components of the extract, indicating the need for further studies in this direction.

4. Materials and Methods

4.1. Extraction of Brazilian Red Propolis

Red propolis raw material were obtained from the Cooperative of Beekeepers of Canavieiras (COAPER) in Bahia, Brazil. This study was registered with the National System for Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under registration number AF234D8. One kilogram of red propolis was placed in Erlenmeyer flasks and mixed with a hydroalcoholic solution (ethanol/water 7:3). After soaking for two hours, the propolis was ground using a mixer-type processor. The solution volume was then adjusted to a 1:5 (g/mL) ratio. The flasks were shaken in an incubator shaker (Innova 4300TM) at 120 rpm and 37 °C for 24 hours. The mixture was subsequently filtered through filter paper. This extraction process was repeated three times. The combined extracts were concentrated under vacuum using a rotary evaporator with a temperature set below 40 °C. The resulting extract was lyophilized and analyzed using high-performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) to determine its chromatographic profile (Figure 5A).

4.2. HPLC-DAD analysis

The crude extract was analyzed using HPLC-DAD, following the developed method from previous studies [55,56]. The extract was prepared in HPLC-grade methanol, filtered through PTFE filters (0.45 µm), and stored in vials. Analysis was performed on a Waters® 2695 HPLC system with binary pumps, an automatic injector, and a diode array detector, managed by Empower 3 software. The stationary phase used a Supelco Ascentis Express C18 column (2.7 µm × 150 mm × 4.6 mm) coupled with an analytical Synergi Polar-RP pre-column (4.0 × 3.0 mm, 4 µm). The mobile phase consisted of water acidified with formic acid (0.1%) and HPLC-grade acetonitrile, with a flow rate of 1 mL/min and a 10 µL injection volume. The gradient elution started with 20% acetonitrile, increased to 50% over 40 minutes, reached 100% by 90 min, held until 95 minutes, and returned to 20% by 100 minutes. Detection spanned 210–600 nm, focusing on 280 nm for chromatogram A. The identification of the major compounds was performed according to Aldana-Mejía et al., 2021 (Figure 5B).

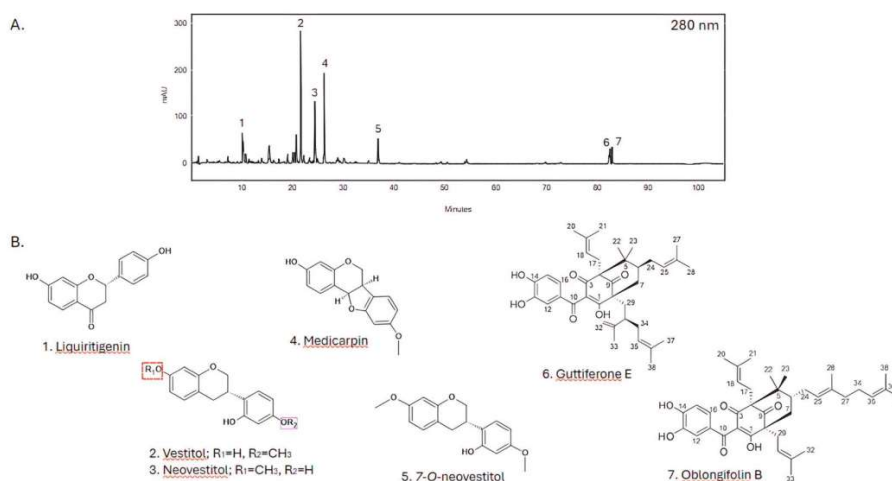


Figure 5 – (A) Brazilian red propolis chromatographic profile using HPLC-DAD at 280 nm absorption. Peaks are numbered (A) with respective chemical structures and names shown below (B).

4.3. Commercial drugs

Isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Stock solutions were prepared according to the manufacturer's instructions, initially at a concentration of 10.000 µg/mL, aliquoted, and kept frozen until the time of use.

4.4. *Mycobacteria* strains

M. tuberculosis H37Rv (ATCC 27294), *M. avium* (ATCC 25291) and *M. kansasii* ATCC 12478) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Clinically isolated strains of *M. tuberculosis*, *M. avium* and *M. kansasii* were kindly supplied by the Adolfo Lutz Institute (São Paulo – SP) and are part of the culture collection of the Laboratory of Antimicrobial Testing (LEA), maintained under cryopreservation at -80°C.

M. tuberculosis strain with resistance to RIF (TB RR) was detected through the Rapid Molecular Test for Tuberculosis (TRM-TB) using the GeneXpert System (Cepheid), originating from a clinical isolate at the Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia. It was grown in Löwenstein-Jensen medium and generously provided by the Microbiology Service of the Clinical Analysis Laboratory Unit of the same institution.

All strains were subcultured in Ogawa-Kudoh culture medium (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) and incubated at 37°C for 15 days until they reached the exponential growth necessary for the assays.

4.5. Raw 264.7 cell culture and maintenance

Murine macrophage-like Raw 264.7 cells (ATCC TIB-71) were cultured in 25 cm² flasks using RPMI 1640 medium (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with penicillin at 100 U/mL, streptomycin at 100 µg (both Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, Brazil). Cell culture was incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Cell culture maintenance was carried out by serial passaging every two days, using a cell scraper, and replacing the RPMI-FBS medium [57].

4.6. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC is the lowest concentration of an antimicrobial, measured in µg/mL, that completely inhibits the growth of bacteria under specific *in vitro* conditions within a pre-determined time frame [35]. This research assessed the antibacterial efficacy of CHEBRP against *Mycobacterium* species using the broth microdilution method with Middlebrook 7H9 medium (Difco, Detroit, USA). Serial dilutions of CHEBRP, INH and RIF were conducted in sterile 96-well polystyrene microplates. To prevent desiccation during incubation, the outer wells were filled with sterile distilled water, and controls for bacterial growth and broth sterility were included. The experiment was conducted in triplicate.

In summary, CHEBRP was dissolved in 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain final concentrations ranging from 31.25 to 2.000 µg/mL. The inoculum was prepared by transferring a range of colonies grown in Ogawa-Kudoh (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) medium into a tube containing glass beads with 500 µL of sterile water. A 200 µL portion

was then transferred to a tube containing 2 mL of Middlebrook 7H9 medium supplemented with oleic acid, bovine albumin, sodium chloride, dextrose, and catalase (OADC), and incubated at 37°C for 7 days, being subsequently compared with a McFarland scale of 1. Following this, the inoculum was adjusted to reach a cell density of 6×10^6 CFU/mL.

Standard antibiotics INH and RIF were employed at concentrations ranging from 0.015 to 1.0 µg/mL, except for the TB RR strain, for which the final concentration of the antibiotic rifampicin was 200 µg/mL. The plates were then incubated at 37°C for 7 days. After the incubation period, 30 µL of a 0.01% resazurin solution was added to each well to assess bacterial growth. The plates were reincubated at 37°C for an additional 24 hours before reading. Color change was indicative of viability following the REMA protocol [36].

4.7. Checkerboard synergy assay

The synergistic effects of combinations of CHEBRP with INH and RIF were evaluated by fractional inhibitory concentration index (FICI) for each of the tested mycobacteria. Checkerboard assays, based on the method described by Bhushal et al. [58] with modifications, were conducted in triplicate on 96-well plates. The strains tested included three *M. tuberculosis* strains (ATCC, IC, and TB RR), as well as *M. kansasii* ATCC and a clinical isolate due to their higher MIC results. Initially, serial dilutions of CHEBRP were prepared in 100 µL of 7H9 OADC broth in columns 1 of the plates (wells from rows A to G), starting at four times the MIC value for each mycobacterial strain. Similarly, serial dilutions of the antibiotics INH and RIF were prepared in wells from rows H (columns 3 to 11), starting at four times the MIC. Combined MIC were performed in wells from columns 2 to 11, rows A to G, containing 50 µL of 7H9 broth. For CHEBRP, 50 µL of a concentration eight times the MIC was added to the first row of each column, followed by vertical serial dilutions. For antibiotics, dilutions were performed in ten test tubes, with the first tube containing a concentration four times the MIC of each strain. Then, 50 µL from tube 1 was added to wells in column 2 of each plate up to row G. The process continued with subsequent tubes, with 50 µL transferred to columns 3 and so forth until tube 10, from which the same volume was added to column 11. Subsequently, 100 µL of standardized inocula (prepared as in the MIC assay) were added to all wells, and plates were incubated at 37°C for seven days. Afterward, 30 µL of 0.1% resazurin solution was added, and the plates were reincubated at 37°C for an additional 24 hours before reading. FICI were calculated using the formula $FICI = (MIC A + B / MIC A) + (MIC B + A / MIC B)$, where MIC A + B represents the Minimum Inhibitory Concentration of drug A in combination with drug B, and MIC B + A represents the MIC of drug B in combination with drug A. MIC A and MIC B represent the MIC of drugs A and B when tested individually. Interpretation of results followed these criteria: FICI ≤ 0.5 indicated synergy; FICI > 0.5 and < 1, additive effect; FICI ≥ 1 and < 4, indifference; and ICIF ≥ 4, antagonism [59].

4.8. Inhibition of biofilm formation

The assay aimed to determine whether CHEBRP could inhibit monospecies biofilm formation. Strains with MIC ≤ 125 µg/mL from *Mycobacterium* species were used, cultured in Ogawa Kudoh medium at 37°C for 15 days. The procedure closely mirrored MIC determination for planktonic cells, employing microdilutions of CHEBRP in 96-well plates containing Middlebrook 7H9 broth. INH served as the standard control, with similar wells used as positive controls. The assays were conducted in triplicate, assessing both biomass and metabolic activity of the biofilm across different plates.

After incubation of the plates, wells were washed to remove planktonic cells, preserving the biofilm. The biofilm was fixed with methanol, stained with crystal violet, and then solubilized with 95% ethanol. Spectrophotometric reading at 570 nm was conducted

to interpret the results. Biofilm formation was considered when the absorbance was equal to or greater than 1.0 [60]. The percentage of inhibition was calculated using the formula: Inhibition (%) = $100 - (\text{average absorbance of treated wells} \times 100) / \text{average absorbance of control wells (untreated)}$. Through the analysis of the results, it was possible to obtain the Minimum Inhibitory Concentration of Biofilm (MIC_{B50}), defined as the lowest concentration of EBPVB that showed 50% or more inhibition of biofilm formation compared to the positive control. [61].

To assess the metabolic activity of mycobacterial biofilms after exposure to CHEBRP, the MTT (bromide of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromide tetrazolium)) dye technique was used as a cellular viability indicator. MTT is reduced by enzymes in live cells, forming insoluble crystals that can be measured spectrophotometrically. After incubating the plates, supernatant was carefully removed from the wells without damaging the biofilms. Subsequently, an MTT solution (5 mg/mL in PBS buffer) was added, and the plate was incubated again. After the reaction, the liquid was aspirated and replaced with DMSO to solubilize the formed crystals [60]. The absorbance was measured at 490 nm. The reduction in mycobacterial viability within the biofilm was calculated by comparing the absorbance of treated and untreated wells using the same formula as described in the biomass reduction assay above.

4.9 .Cytotoxicity test

The cytotoxic effect of CHEBRP on murine macrophages, Raw 264.7, was evaluated based on the protocol described by Islam et al. [62] with modifications. Initially, cells were cultured in 96-well plates (1×10^4 cells/well) containing 200 μ L of RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and incubated overnight at 37°C in 5% CO₂. Upon reaching 80% confluence, wells were washed with PBS and treated with eight concentrations of CHEBRP ranging from 512 to 4 μ g/mL (1:2 dilutions), with the assay performed in triplicate.

Wells containing only cells with culture medium and cells with solvent (DMSO) were used as controls, while INH, at concentrations ranging from 25 to 0.19 μ g/mL, was employed as the standard antibiotic. After 72 hours, 100 μ L of MTT reagent at 0.5 mg/mL was added to each well and incubated in a CO₂ incubator at 37°C for 4 hours. After this time, the medium was aspirated, and the formazan crystals were solubilized with 100 μ L of DMSO. Finally, absorbance was measured at 570 nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, USA), and the optical densities (OD) obtained were converted into percentage cell viability by comparison with the control group according to the formula: % Viability = $(\text{OD Treated Group} \times 100) / \text{Mean OD Control Group}$ [57].

4.10. Intracellular anti-mycobacterial activity

Raw 264.7 macrophages were exposed to a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 of *M. tuberculosis* ATCC and TB RR. Inoculums of 1×10^5 CFU/well were prepared following the MIC test. Raw 264.7 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum and adjusted to 1×10^4 cells/100 μ L/well in 96-well plates, incubated for 24 hours at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The cultures were then infected and incubated for two hours to allow bacilli internalization, followed by washing with phosphate-buffered saline (PBS) to remove non-phagocytized mycobacteria. Subsequently, cells were treated with CHEBRP and INH at concentrations equivalent to the MIC and $\frac{1}{2}$ MIC of each strain and incubated for 72 hours at 37°C in CO₂. Controls included wells with untreated infected cells and infected cells treated only with DMSO. After three days, the

wells were washed again with PBS, the macrophages were lysed with 0.2% Triton X-100, and bacterial viability was determined by luminescence assay [63].

4.11. Luminescent microbial cell viability assay

The cell lysates were transferred to a 96-well opaque-walled plate. Bacterial viability assay was performed using the BacTiter-Glo™ kit (Promega), following the manufacturer's instructions. Six determinations were carried out for each control, CHEBRP and INH at different concentrations. Control wells containing only medium (without cells) were used to obtain the luminescence background, which was read on a GloMax Explorer luminometer after 1 second of exposure.

4.12. Statistical analysis

All data were expressed as means $\pm$ standard deviations (SD). Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 8.0 (Graph Pad Software, Inc., CA, USA). One-way ANOVA was used for analysis of variance and multiple comparisons between the means of experiments, complemented by Tukey's test. Non-parametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

5. Conclusions

Drawing upon the findings of this study, it is evident that the crude hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis (CHEBRP) exhibits promising *in vitro* antimycobacterial activity against ATCC and clinically isolated strains, without impeding the efficacy of a commonly used antibiotic in standard therapy. In addition to the promising effect on planktonic cells, it was demonstrated that CHEBRP is effective in inhibiting the formation of mycobacterial biofilms and reducing their viability. Our results also demonstrated that CHEBRP showed significant efficacy in eradicating intramacrophage bacilli in both tested strains of *M. tuberculosis*, without causing significant toxicity to the Raw 264.7 macrophages used.

Finally, we conclude that CHEBRP may have relevance in the discovery of new antimycobacterial drugs. However, additional studies are needed to investigate its mechanism of action, evaluate its *in vivo* effects, and determine its therapeutic potential against species of the genus *Mycobacterium*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Fedrizzi T, Meehan CJ, Grottola A, Giacobazzi E, Fregni Serpini G, Tagliazucchi S, et al. Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Sci Rep.* **2017**;7(August 2016):1–14.
- Armstrong DT, Eisemann E, Parrish N. A Brief Update on Mycobacterial Taxonomy, 2020 to 2022. Humphries RM, editor. *J Clin Microbiol.* **2023** Apr 20;61(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.00331-22>
- Holzheimer M, Buter J, Minnaard AJ. Chemical Synthesis of Cell Wall Constituents of Mycobacterium tuberculosis. *Chem Rev.* **2021**;121(15):9554–643.
- Huang L, Nazarova E V., Russell DG. Mycobacterium tuberculosis: Bacterial fitness within the host macrophage. *Bact Intracellular.* **2020**;127–38.
- Chakraborty P, Bajeli S, Kaushal D, Radotra BD, Kumar A. Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun.* **2021**;12(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-21748>
- SAKULA A. tubercle bacillus, **1882**. *Thorax.* 1982; 37:246–51.
- Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol.* **2021**;11(November):1–20.
- World Health Organization. The End Strategy TB. End TB Strateg. **2015**;53(9):1689–99.
- World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. WHO Press. **2022**. 98 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Ações Programáticas Estratégicas B. Manual para o Controle da Tuberculose. Ministério da Saúde. **2019**. 364 p. Available from: https://www.telelab.aids.gov.br/index.php/biblioteca-telelab/item/download/172_d411f15deeb01f23d9a556619ae965c9
- Khoshnood S, Taki E, Sadeghifard N, Kaviar VH, Haddadi MH, Farshadzadeh Z, et al. Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Front Microbiol.* **2021**;12(October):1–13.
- Mallick JS, Nair P, Abbew ET, Van Deun A, Decroo T. Acquired bedaquiline resistance during the treatment of drug-resistant tuberculosis: a systematic review. *JAC-Antimicrobial Resist.* **2022**;4(2).
- Falkinham JO. Ecology of nontuberculous mycobacteria. *Microorganisms.* **2021**;9(11):1–10.
- Hossain R, Quispe C, Khan RA, Saikat ASM, Ray P, Ongalbek D, et al. Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. *Chinese Med (United Kingdom).* **2022**;17(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00651-2>
- Salatino A, Salatino MLF, Negri G. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis? *Apidologie.* **2021**;52(6):1075–97.
- Sforzin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? Vol. 133, *Journal of Ethnopharmacology.* **2011**. p. 253–60.
- Kasote D, Bankova V, Viljoen AM. Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochem Rev.* **2022**;1. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09816-1>
- Vadillo-Rodríguez V, Cavagnola MA, Pérez-Giraldo C, Fernández-Calderón MC. A physico-chemical study of the interaction of ethanolic extracts of propolis with bacterial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* **2021**;200(November 2020).
- Nichitai MM, Josceanu AM, Isopescu RD, Isopescu GO, Geana EI, Ciucure CT, et al. Polyphenolics profile effects upon the antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts. *Sci Rep.* **2021**;11(1):1–12.
- Sousa LRD, Amparo TR, Souza GHB de, Ferraz AT, Fonseca K da S, Azevedo AS De et al. Anti-Trypanosoma cruzi Potential of Vestitol Isolated from Lyophilized Red Propolis. *Molecules.* **2023** Nov 28;28(23):7812. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/23/7812>
- Sallehi S, Lekired A, Korbi N, Saadoui I, Cherif A, Zidi I, et al. Fungal Community Investigation from Propolis Natural Products: Diversity and Antibacterial Activities Evaluation. *Evidence-based Complement Altern Med.* **2022**.
- Magnavacca A, Sangiovanni E, Racagni G, Dell'Agli M. The antiviral and immunomodulatory activities of propolis: An update and future perspectives for respiratory diseases. *Med Res Rev.* **2022**;42(2):897–945.
- Pereira FAN, Barboza JR, Vasconcelos CC, Lopes AJO, Ribeiro MN de S. Use of stingless bee propolis and geopropolis against cancer—a literature review of preclinical studies. *Pharmaceuticals.* **2021**;14(11).
- Conte FL, Tasca KI, Santiago KB, de Oliveira Cardoso E, Romagnoli GG, de Assis Golim M, et al. Propolis increases Foxp3 expression and lymphocyte proliferation in HIV-infected people: A randomized, double blind, parallel-group and placebo-controlled study. *Biomed Pharmacother.* **2021**;142(April).
- Regueira MS, Tintino SR, da Silva ARP, Costa M do S, Boligon AA, Matias EFF, et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol.* **2017** Sep;107:572–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.052>
- YONG K. PARK,* SEVERINO M. ALENCAR ACLA. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem* **2002**, 50, 2502–2506 Bot. 2002;795–812.
- Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based Complement Altern Med.* **2006**;3(2):249–54.

28. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-based Complement Altern Med.* **2008**;5(3):313–6.
29. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. *Evidence-based Complement Altern Med.* **2008**;5(4):435–41.
30. Ccana-Ccpatinta GV, Mejía JAA, Tanimoto MH, Groppo M, Carvalho JCAS de, Bastos JK. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. *Molecules.* **2020** Apr 28;25(9):2060. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/9/2060>
31. Boeing T, Mejía JAA, Ccana-Ccpatinta GV, Mariott M, Melo Vilhena de Andrade Fonseca Da Silva R de C, de Souza P, et al. The gastroprotective effect of red propolis extract from Northeastern Brazil and the role of its isolated compounds. *J Ethnopharmacol.* **2021** Mar; 267:113623. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037887412033511X>
32. de Souza Silva T, Silva JMB, Braun GH, Mejía JAA, Ccpatinta GVC, Santos MFC, et al. Green and Red Brazilian Propolis: Antimicrobial Potential and Anti-Virulence against ATCC and Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria. *Chem Biodivers.* **2021**;18(8).
33. Maiolini M, Gause S, Taylor J, Steakin T, Shipp G, Lamichhane P, et al. The war against tuberculosis: A review of natural compounds and their derivatives. *Molecules.* **2020**;25(13).
34. Wijesundara NM, Vasantha Rupasinghe HP. Bactericidal and anti-biofilm activity of ethanol extracts derived from selected medicinal plants against streptococcus pyogenes. *Molecules.* **2019**;24(6).
35. CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes- 2 nd ed. Document M24S performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA., **2023**
36. Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: A review of colourimetric methods. *Clin Microbiol Infect.* **2007**;13(8):754–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01698.x>
37. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez AG, Nakamura CV, Prado B, et al. Screening PI Medicinaiis *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2002**;97(7):1027–31.
38. Tosun F, Kizilay ÇA, Şener B, Vural M, Palittapongarnpim P. Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *J Ethnopharmacol.* **2004**;95(2–3):273–5.
39. Nguta JM, Appiah-Opong R, Nyarko AK, Yeboah-Manu D, Addo PGA, Otchere I, et al. Antimycobacterial and cytotoxic activity of selected medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol.* **2016**;182:10–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.010>
40. Tekwu EM, Askun T, Kuete V, Nkengfack AE, Nyasse B, Etoa FX, et al. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethno-medically used against strains of Mycobacterium tuberculosis. *J Ethnopharmacol.* **2012**;142(2):374–82.
41. Freires IA, De Alencar SM, Rosalen PL. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur J Med Chem.* **2016**;110:267–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>
42. Almuhayawi MS. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J Biol Sci.* **2020**;27(11):3079–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016>
43. Hossain S, Yousaf M, Liu Y, Chang D, Zhou X. An Overview of the Evidence and Mechanism of Drug–Herb Interactions Between Propolis and Pharmaceutical Drugs. *Front Pharmacol.* **2022**;13(April):1–24.
44. Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial properties of propolis. *Molecules.* **2019**;24(11):11–3.
45. Kalia P, Kumar NR, Harjai K. Studies on the therapeutic effect of propolis along with standard antibacterial drug in Salmonella enterica serovar Typhimurium infected BALB/c mice. *BMC Complement Altern Med.* **2016**;16(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1474-5>
46. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Vol. 2, *Nature Reviews Drug Discovery.* **2003**. p. 114–22.
47. Hancock REW, Alford MA, Haney EF. Antibiofilm activity of host defence peptides: complexity provides opportunities. *Nat Rev Microbiol.* **2021** Dec 28;19(12):786–97. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00585-w>
48. Galié S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol.* **2018** May 7;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.00898/full>
49. Niño-Padilla EI, Velázquez C, Garibay-Escobar A. Mycobacterial biofilms as players in human infections: a review. *Biofouling.* **2021**;37(4):410–32. Available from: <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1925886>
50. Muñoz-Egea MC, Akir A, Esteban J. Mycobacterium biofilms. *Biofilm.* **2023**;5(February):1–7.
51. Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Casarin RCV, Alencar SM, Rosalen PL, et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *J Ethnopharmacol.* **2017**;207(June):100–7.
52. Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phyther Res.* **2016**;30(6):894–905.
53. MAGNAVACCA, A. et al. The antiviral and immunomodulatory activities of propolis: An update and future perspectives for respiratory diseases. *Medicinal Research Reviews*, v. 42, n. 2, p. 897–945, **2022**.
54. Conti BJ, Santiago KB, Búfalo MC, Herrera YF, Alday E, Velázquez C, et al. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *J Pharm Pharmacol.* **2015** Sep 8;67(10):1431–8.

55. Aldana-Mejía, J. A. et al. A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 198, **2021**.
56. Ccana-Ccapatinta, G. V. et al. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. *Molecules*, v. 25, n. 9, p. 2060, 28 abr. **2020**.
57. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (**1983**)
58. Bhusal Y, Shiohira CM, Yamane N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents*. **2005**;26(4):292–7.
59. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*. **2002**;49(2):345–51.
60. Carter G, Wu M, Drummond DC, Bermudez LE. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *J Med Microbiol*. **2003**;52(9):747–52.
61. Wei GX, Campagna AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother*. **2006**;57(6):1100–9.
62. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*. **2005**;55(4):500–5.
63. Islam MI, Seo H, Kim S, Sadu VS, Lee KI, Song HY. Antimicrobial activity of IDD-B40 against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. **2021**;11(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80227-y>